



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET NOVI SAD



Mr Dragana Budakov

**OSETLJIVOST *Cercospora beticola* (Sacc.) PROUZROKOVAČA  
PEGAVOSTI LIŠĆA ŠEĆERNE REPE PREMA FUNGICIDIMA**

-Doktorska disertacija-

Novi Sad, 2014

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**POLJOPRIVREDNI FAKULTET NOVI SAD**  
**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Mr Dragana Budakov
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Vera Stojšin, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad
Naslov rada: NR	Osetljivost <i>Cercospora beticola</i> (Sacc.) prouzrokovala pegavosti lišća šećerne repe prema fungicidima
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2014
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Departman za fitomedicinu i zaštitu životne sredine

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja / stranica / slika / grafikona / referenci / priloga) 10 poglavlja / 149 strana / 20 slika / 15 grafikona / 140 navoda literature / 2 priloga
Naučna oblast: NO	Fitomedicina
Naučna disciplina: ND	Fitopatologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Ključne reči: <i>Cercospora beticola</i> , šećerna repa, rezistentnost prema fungicidima, karbendazim, flutriafol, tetrakonazol, azoksistrobin, CAPS markeri, efikasnost fungicida.
UDK	582.661.15:615.282:616.5-002.828
Čuva se: ČU	Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta Novi Sad
Važna napomena: VN	-
Izvod: IZ	<p><i>Cercospora beticola</i>, prouzokovač pegavosti lišća šećerne repe je ekonomski najznačajnije oboljenje lista, koje se primarno suzbija primenom fungicida. U Srbiji je za suzbijanje ovog parazita registrovan i široko primenjivan veći broj preparata iz grupa MBC fungicida (benzimidazoli), DMI fungicida (triazoli i imidazoli), kao i Qol fungicida (metoksi-akrilati). Fungicidi iz navedenih grupa imaju specifičan mehanizam delovanja, te kod njih postoji visok rizik od pojave rezistentnosti kod fitopatogenih gljiva, što predstavlja najvažniji ograničavajući faktor u suzbijanju pegavosti lišća šećerne repe koju prouzrokuje <i>C. beticola</i>.</p> <p>Ukupno 103 monosporijalnih izolata su prikupljeni sa 60 lokaliteta iz vodećih regiona gajenja šećerne repe u Srbiji. Za utvrđivanje nivoa osetljivosti referentne populacije <i>C. beticola</i> korišćeno je 5 izolata sa cvekle i blitve, koji su izolovani s lokaliteta na kojima nikad nisu primenjivani fungicidi. Na osnovu EC<sub>50</sub> vrednosti referentne populacije <i>C. beticola</i>, utrđena je diskriminativna koncentracija za svaki ispitivani fungicid: karbendazim 5 µg/ml, flutriafol 1.25 µg/ml, tetrakonazol 0.6 µg/ml i azoksistrobin 0.1 µg/ml. Rezistentost prema karbendazimu je detektovana kod 96% izolata, dok je udeo izolata koji su rezistentni prema triazolima iznosio 9.2% za tetrakonazol i 16.3% za flutriafol. Svi izolati koji su razvili rezistentnost prema triazolima su bili rezistentni i na karbendazim, što je prvi nalaz dvostruke rezistentnosti na ove fungicide kod <i>C. beticola</i>. Osetljivost prema azoksistrobinu je ostala nepromenjena s obzirom da se ni jedan od ispitivanih izolata nije razvijao na podlozi sa dodatim fungicidom. Rezultati primene CAPS markera u detekciji izolata koji su rezistentni prema flutriafolu i karbendazimu podudarala se nalazima <i>in vitro</i> testova. Efikasnost karbendazima,</p>

flutriafola, azoksistrobina i tetrakonazola u preporučenim dozama je ispitana u poljskim ogledima sa veštačkim inokulacijama izolatima *C. beticola* koji su osetljivi ili rezistentni prema karbendazimu i flutriafolu. Karbendazim i flutriafol su bili nedovoljno efikasni u suzbijanju pegavosti lišća koja je prouzrokovana izolatima koji su razvili rezistentnost prema ovim fungicidima, dok su pokazali dobru efikasnost u kontroli pegavosti koja je prouzrokovana osetljivim izolatima *C. beticola*. S druge strane, azoksistrobin i tetrakonazol su pokazali dobru efikasnost u suzbijanju oboljenja bez obzira na nivo osetljivosti izolata korišćenih u veštačkim inokulacijama. Prikazani rezultati daju doprinos razvoju strategije za monitoring osetljivosti populacije *C. beticola*, koji predstavlja odlučujući faktor za efikasno suzbijanje pegavosti lišća šećerne repe. Identifikacija smanjene osetljivosti prema fungicidima je od suštinskog značaja za uspostavljanje novih strategija u rešavanju problema pojave rezistentnosti *C. beticola*, kao i za odabir fungicida koji će se primenjivati na lokalitetima na kojima je došlo do pojave smanjene osetljivosti ili rezistentnosti parazita.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	12.12.2008. godine
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>predsednik: Dr Stevan Maširević, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet Novi Sad</p> <p>_____</p> <p>član: Dr Vera Stojšin, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet Novi Sad - mentor</p> <p>_____</p> <p>član: Dr George Karaoglanidis, docent, Univerzitet u Solunu, Grčka</p> <p>_____</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF AGRICULTURE  
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Dragana Budakov, MSc
Mentor: MN	Dr Vera Stojšin, Full Professor, Faculty of Agriculture Novi Sad
Title: TI	Sensitivity of <i>Cercospora beticola</i> (Sacc.) the causer of sugar beet leaf spot to fungicides
Language of text: LT	Serbian (Latin letter)
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2014
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Faculty of Agriculture Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Department for Environmental and Plant Protection

Physical description: PD	10 chapters / 149 pages / 20 figures / 15 charts / 140 references / 2 appendixes
Scientific field SF	Phytomedicine
Scientific discipline SD	Phytopathology
Subject, Key words SKW	Key words: <i>Cercospora beticola</i> , sugar beet, fungicide resistance, carbendazim, flutriafol, tetraconazole, azoxystrobin, CAPS markers, fungicide efficacy.
UDC	582.661.15:615.282:616.5-002.828
Holding data: HD	Library of the Faculty of Agriculture Novi Sad
Note: N	-
Abstract: AB	<p><i>Cercospora beticola</i>, causal agent of sugar beet leaf spot, is economically the most significant sugar beet leaf pathogen, primarily controlled by fungicides. In Serbia, fungicides from groups of benzimidazoles, DMIs and strobilurins have been widely used. Since these fungicide groups have a site-specific mode of action, there is a high risk for resistance development in target organisms, which is the most important limiting factor of CLS chemical control.</p> <p>One hundred and three single-conidia isolates were collected from 60 representative localities in leading sugar beet production region in Serbia. Five isolates causing leaf spot on chard and beetroot from localities on which fungicides were never applied, were tested as a referent population for baseline sensitivity. Based on EC<sub>50</sub> values of referent isolates, discriminatory concentrations for each tested fungicide were established: carbendazim 5 µg/ml, flutriafol 1.25 µg/ml, tetraconazole 0.6 µg/ml and azoxystrobin 0.1 µg/ml. Resistance to carbendazim was detected in 96% of isolates, whereas frequency of resistant isolates to triazole fungicides varied from 9.2 % to 16.3 % for tetraconazole and flutriafol, respectively. All isolates resistant to triazoles were resistant to carbendazim as well which, to our knowledge, is the first report of double resistance to fungicides in <i>C. beticola</i>. Sensitivity to azoxystrobin remained unchanged since none of tested isolates developed on fungicide amended medium. Detection of resistant isolates to flutriafol and carbendazim using CAPS markers confirmed the results of the <i>in vitro</i> tests. The efficacy of carbendazim, flutriafol, azoxystrobin and tetraconazole at commercially recommended dose was evaluated in field trials where sugar beet plants were inoculated with isolates sensitive and resistant to flutriafol and carbendazim. Carbendazim and flutriafol efficacy was very low in plots inoculated with isolates resistant to these fungicides, while they were efficient control of disease caused by sensitive isolates. Azoxystrobin and tetraconazole showed good efficacy in disease control regardless of the isolate</p>

sensitivity.

Presented results will contribute to the development of pathogen population sensitivity monitoring strategy which could be used for effective CLS management in the region. Also, identification of decreased sensitivity of *C. beticola* to benzimidazoles and triazoles can help researchers in examining the potential of different fungicide resistance management practices, as well as in selection of fungicides to be used in areas where decreased sensitivity or resistance occurred.

Accepted on Scientific Board on:  
AS

12.12.2008.

Defended:  
DE

Thesis Defend Board:  
DB

president: Dr Stevan Maširević, Full Professor,  
Faculty of Agriculture Novi Sad

\_\_\_\_\_

member: Dr Vera Stojšin, Full Professor,  
Faculty of Agriculture Novi Sad - mentor

\_\_\_\_\_

member: Dr George Karaoglanidis, Assistant  
Professor, University of Thessaloniki, Greece

\_\_\_\_\_

## SADRŽAJ

<b>UVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>12</b>
<b>RADNA HIPOTEZA</b> .....	<b>13</b>
<b>PREGLED LITERATURE</b> .....	<b>14</b>
CERCOSPORA BETICOLA -PROUZROKOVAČ PEGAVOSTI LIŠĆA ŠEĆERNE REPE .....	14
<i>Istorijat</i> .....	14
<i>Taksonomija vrste</i> .....	15
<i>Simptomi oboljenja</i> .....	16
<i>Životni ciklus i epidemiologija</i> .....	17
<i>Mere zaštite</i> .....	22
<i>Fungicidi za suzbijanje pegavosti lista šećerne repe</i> .....	25
<i>Pojava rezistentnosti C. beticola prema fungicidima</i> .....	28
REZISTENTNOST PREMA BENZIMIDAZOLIMA .....	31
<i>Rezistentnost prema DMI fungicidima</i> .....	32
REZISTENTNOST PREMA STROBILURINIMA .....	33
UKRŠTENNA REZISTENTNOST .....	34
<b>MATERIJAL I METOD RADA</b> .....	<b>36</b>
UZORKOVANJE LISTOVA ŠEĆERNE REPE .....	36
KOLEKCIJA IZOLATA I DOBIJANJE ČISTIH KULTURA .....	40
MORFOLOŠKE I ODGAJIVAČKE KARAKTERISTIKE .....	40
IN VITRO TESTIRANJA OSETLJIVOSTI PREMA FUNGICIDIMA .....	42
MOLEKULARNE ANALIZE.....	46
<i>Ekstrakcija DNK</i> .....	46
<i>CAPS markeri</i> .....	50
POLJSKI OGLEDI .....	53
<i>Priprema i aplikacija inokuluma</i> .....	53
<i>Dizajn ogleda</i> .....	54
<i>Analiza podataka</i> .....	62
<b>REZULTATI RADA</b> .....	<b>63</b>
FORMIRANJE KOLEKCIJE IZOLATA.....	63
MORFOLOŠKE I ODGAJIVAČKE KARAKTERISTIKE CERCOSPORA BETICOLA .....	66
IN VITRO TESTIRANJA OSETLJIVOSTI PREMA FUNGICIDIMA .....	74
<i>Utvrđivanje diskriminativne koncentracije prema karbendazimu</i> .....	74



<i>Utvrđivanje diskriminativne koncentracije prema flutriafolu .....</i>	<i>75</i>
<i>Utvrđivanje diskriminativne koncentracije prema tetrakonazolu .....</i>	<i>75</i>
<i>Utvrđivanje diskriminativne koncentracije prema azoksistrobinu .....</i>	<i>76</i>
<i>Testiranje kvalitativne osetljivosti izolata prema karbendazimu.....</i>	<i>77</i>
<i>Testiranje kvalitativne osetljivosti izolata prema flutriafolu .....</i>	<i>80</i>
<i>Testiranje kvalitativne osetljivosti izolata prema tetrakonazolu.....</i>	<i>80</i>
<i>Testiranje kvalitativne osetljivosti izolata prema azoksistrobinu .....</i>	<i>81</i>
<b>MOLEKULARNE ANALIZE.....</b>	<b>82</b>
<i>CAPS markeri.....</i>	<i>85</i>
<b>POLJSKI OGLEDI .....</b>	<b>88</b>
<b>DISKUSIJA.....</b>	<b>97</b>
<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>107</b>
<b>PRILOZI.....</b>	<b>110</b>
<b>REFERENCE.....</b>	<b>132</b>

## UVOD

Šećerna repa (*Beta vulgaris* L.) je dvogodišnja biljka iz familije *Chenopodiaceae*. Prema podacima **FAO (2013)** šećerna repa ima 20% udela u ukupnoj proizvodnji šećera na svetskom nivou. Četvorogodišnji prosek (2008-2011) površina i prinosa u svetu iznosi 4.6 miliona ha i 45.2 t/ha (**FAO, 2013**). Kada je u pitanju Srbija, u periodu od 2009 do 2011 šećerna repa se gajila u proseku na 61.157 ha sa prinosom od 48,8 t/ha. Vodeći proizvodni region u Srbiji je Vojvodina sa 97% površina (**Stat. God. Srb., 2012**).

Pegavost lišća, koju prouzrokuje fitopatogena gljiva *Cercospora beticola* Sacc., je ekonomski najznačajnije i najdestruktivnije oboljenje šećerne repe. *C. beticola* se javlja u regionima sa toplom i vlažnom klimom, gde su prosečne mesečne temperature najmanje 20 °C u kombinaciji sa sumom mesečnih padavina od najmanje 80 mm tokom vegetacione sezone (**Holtschulte, 2000**). Ukoliko u povoljnim uslovima za pojavu oboljenja odsustvuju mere zaštite, visok intenzitet pojave pegavosti lista šećerne repe dovodi do značajnog smanjenja prinosa korena i sadržaja šećera. Pored navedenog, u korenu se povećava sadržaj nečistoća, što povećava troškove prerade korena (**Windels i sar., 1998; Jacobsen i Franc, 2009**). Štete u uslovima visokog intenziteta oboljenja mogu iznositi preko 40% u prinosu korena i preko 10% u kristalnom šećeru (**Holtschulte, 2000; Jacobsen i Franc, 2009**).

Mere zaštite od pegavosti lista šećerne repe na prvom mestu obuhvataju primenu fungicida, a pored njih se preporučuje gajenje tolerantnih genotipova šećerne repe, plodored i optimalna obrada zemljišta (**Weiland i Koch, 2004**). U agroekološkim uslovima u kojima je infektivni

pritisak visok, fungicidi se često primenjuju više puta tokom vegetacije. Ovakvi uslovi pogoduju selekciji populacije patogena i stvaranju rezistentnosti prema fungicidima, što je jedan od najvažnijih ograničavajućih faktora u hemijskoj kontroli ovog oboljenja (**Karaoglanidis i Ioannidis, 2010**). Za zaštitu šećerne repe protiv *C. beticola* registrovani su protektivni i sistemski fungicidi iz nekoliko klasa, s različitim mehanizmom delovanja (**Ioannidis i Karaoglanidis, 2000**), a od velikog značaja je dostupnost i primena fungicida koji spadaju u grupe sa različitim mehanizmom delovanja radi odlaganja pojave rezistentnosti (**Weiland i Koch, 2004**). Kod fungicida, kao što su benzimidazoli, triazoli (DMI) i strobilurini (QoI), koji se odlikuju specifičnim mehanizmom delovanja (site-specific), postoji visok rizik od pojave rezistentnosti (**Brent i Hollomon, 2007a**), a u pojedinim regionima gajenja šećerne repe registrovana je rezistentnost na fungicide iz pomenutih grupa (**Georgopoulos i Dovas, 1973; Ruppel i Scott, 1974; Marić i sar., 1976; Weiland i Halloin, 2001; Karaoglanidis i sar., 2000; Kirk i sar., 2012**).

## CILJ ISTRAŽIVANJA

S obzirom na specifične mehanizme delovanja koje poseduju fungicidi koji se primenjuju za suzbijanje *C. beticola* i na visok rizik od pojave rezistentnosti kod ovog parazita, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

- Formiranje kolekcije izolata iz vodećih regiona gajenja šećerne repe u Vojvodini.
- Ispitivanje odgajivačkih i morfoloških karakteristika izolata *C. beticola*.
- Utvrđivanje nivoa osetljivosti populacije *C. beticola* na fungicide iz grupa benzimidazola (MBC), triazola (DMI) i metoksi-akrilata (QoI) primenom *in vitro* metoda i uz pomoć DNK markera.
- Ispitivanje biološke efikasnosti fungicida u suzbijanju prouzrokovača pegavosti lišća šećerne repe poznate osetljivosti prema benzimidazolima (MBC), triazolima (DMI) i metoksi-akrilatima (QoI).
- Utvrđivanje korelacije između rezistentnosti *C. beticola* određene *in vitro* i smanjenja poljske efikasnosti fungicida.

## RADNA HIPOTEZA

Hemijske mere zaštite su ključne u suzbijanju prouzročivača pegavosti lišća šećerne repe *C. beticola*. Nakon više godina primene fungicida iz grupa benzimidazola (MBC), triazola (DMI) i metoksi-akrilata (Qol), polazeći od osnovnih ciljeva istraživanja, postavljena je hipoteza da postoji smanjena osetljivost ili pak rezistentnost izolata *C. beticola* prema fungicidima iz grupa benzimidazola i triazola.

S obzirom na relativno kratku istoriju primene fungicida iz grupe strobilurina (Qol), pretpostavka je da nema promene u osetljivosti populacije *C. beticola* prema ovim fungicidima.

Pretpostavlja se da se izolati koji su ispoljili rezistentnost prema jednoj grupi fungicida mogu uspešno suzbijati u poljskim uslovima primenom fungicida koji imaju drugačiji mehanizam delovanja od onih prema kojima je razvijena rezistentnost.

## PREGLED LITERATURE

### *Cercospora beticola* -prouzrokovatelj pegavosti lišća šećerne repe

#### Istorijat

*Cercospora beticola* Sacc. je prouzrokovatelj pegavosti lista šećerne repe i drugih gajenih i divljih vrsta roda *Beta*. Ova vrsta, poreklom iz centralne Evrope i sa Mediterana (**Groenewald i sar., 2005**), je prva opisana u okviru roda *Cercospora* (**Saccardo, 1876**). Ranije se smatralo da je krug domaćina vrsta iz roda *Cercospora* specifičan za vrste, rodove ili familije biljaka (**Chupp, 1954**). Međutim, istraživanja autora **Crous i Braun (2003)** i **Groenewald i sar. (2006)** pokazuju da krug domaćina vrsta iz roda *Cercospora* nije obavezno vezan za familiju biljaka koje parazitira. Krug domaćina *C. beticola* čine biljne vrste iz rodova *Chenopodium*, *Atriplex*, *Amaranthus*, *Polygonum*, *Lactuca*, *Medicago*, *Glycine*, *Taraxacum*, *Malva*, *Spinacia*, *Limonium* i *Apium*, koje pripadaju različitim familijama (**Ruppel, 1986; Weiland i Koch, 2004; Lartey i sar., 2010**).

Jedan od prvih detaljnijih opisa vrste je dao **von Thümen (1886)**, koji je opisao simptome, patogenezu, širenje i održavanje vrste, a potom i **Halsted (1895)** koji je prvi objavio fotografiju lista šećerne repe sa tipičnim simptomima oboljenja. **Pool i McKay (1916 a, b, 1918)** su utvrdili kako temperatura i relativna vlažnost vazduha utiču na obrazovanje konidija, a zatim objasnili način prezimljavanja, izvore inokuluma i proširili krug domaćina na druge vrste roda *Beta*, kao

i na neke dominantne korovske vrste. Zaključili su da se parazit širi lokalno, sporama koje su nošene vazдушnim strujama, insektima i vodom za navodnjavanje. Takođe su ispitali kako pegavost lista šećerne repe utiče na prinos i sadržaj šećera u korenu. Prve preporuke za suzbijanje *C. beticola*: plodored i uništavanje ostataka zaraženih biljaka je dao **von Thümen (1886)**. **Halsted (1899)** je za zaštitu šećerne repe preporučivao primenu Bordovske čorbe i objavio da među velikim brojem sorti šećerne repe nema razlika u osetljivosti prema ovom parazitu.

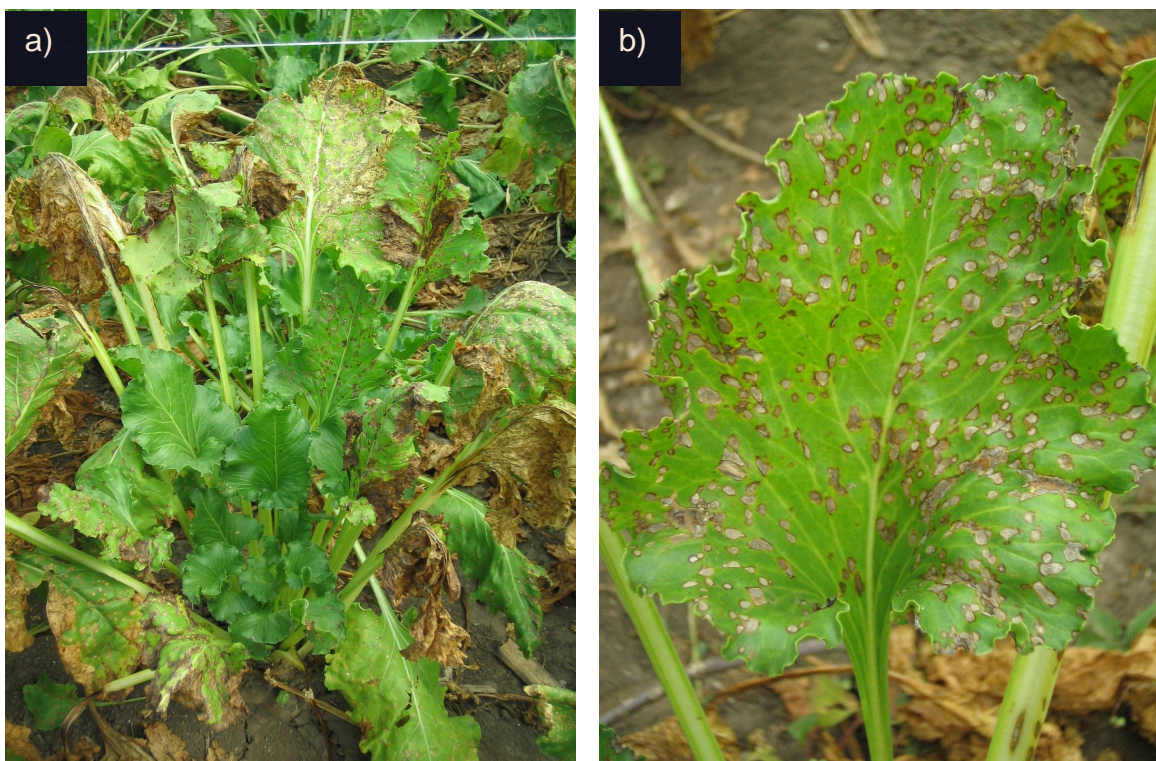
### Taksonomija vrste

*Cercospora beticola* Sacc. pripada carstvu *Fungi*, zbirnoj grupi *Deuteromycetes*, klasi *Hyphomycetes*, redu *Hyphales* i rodu *Cercospora*. Ovaj rod je jedan od najvećih rodova klase *Hyphomycetes*, čiji se teleomorf nalazi u okviru roda *Mycosphaerella* Johanson (**Corlett, 1991; Stewart i sar., 1999; Crous i sar., 2006**). Trenutno je polni stadijum dokazan za svega nekoliko vrsta iz roda *Cercospora* (**Crous i Brown, 2003**), dok je za ostale vrste, među kojima je i *Cercospora beticola*, još uvek nepoznat ili nepotvrđen (**Chupp, 1954; Duffus i Ruppel, 1993; Goodwin i sar., 2003**). Za vrstu *C. beticola* je utvrđeno da je fenotipski veoma divergentna i varijabilna u morfologiji i produkciji konidija, odgajivačkim karakteristikama, patogenosti i osetljivosti prema fungicidima (**Rossi, 1995; Moretti i sar., 2004**). Takođe je i u nekoliko studija dokazana visoka genotipska divergentnost (**Moretti i sar., 2004, 2006, 2010**), što u kombinaciji sa jednakim rasporedom polnih tipova (mating types) u okviru populacije ukazuje na postojanje polne reprodukcije (**Milgroom, 1996; Zhan i sar., 2002**). Prema detaljnim istraživanjima izvora genetske varijacije u okviru populacija *C. beticola*,

postoje indicije da je varijabilnost posledica rekombinacije gena i da *C. beticola* pored bespolnog, poseduje i polni sistem razmnožavanja (Groenwald i sar., 2006, 2007; Moretti i sar., 2010).

### Simptomi oboljenja

Karakterističan simptom *C. beticola* na šećernoj repi su nasumično rapoređene pojedinačne pege, skoro potpuno okruglog oblika, prečnika 2-5 mm (Slika 1 a i b), koje se prvo javljaju na starijem lišću, a nakon toga se oboljenje progresivno širi na mlađe (Duffus i Ruppel, 1993; Jacobsen i Franc, 2009; Franc, 2010).



Slika 1a i b: Simptomi *Cercospora beticola* na listovima šećerne repe (Orig.)



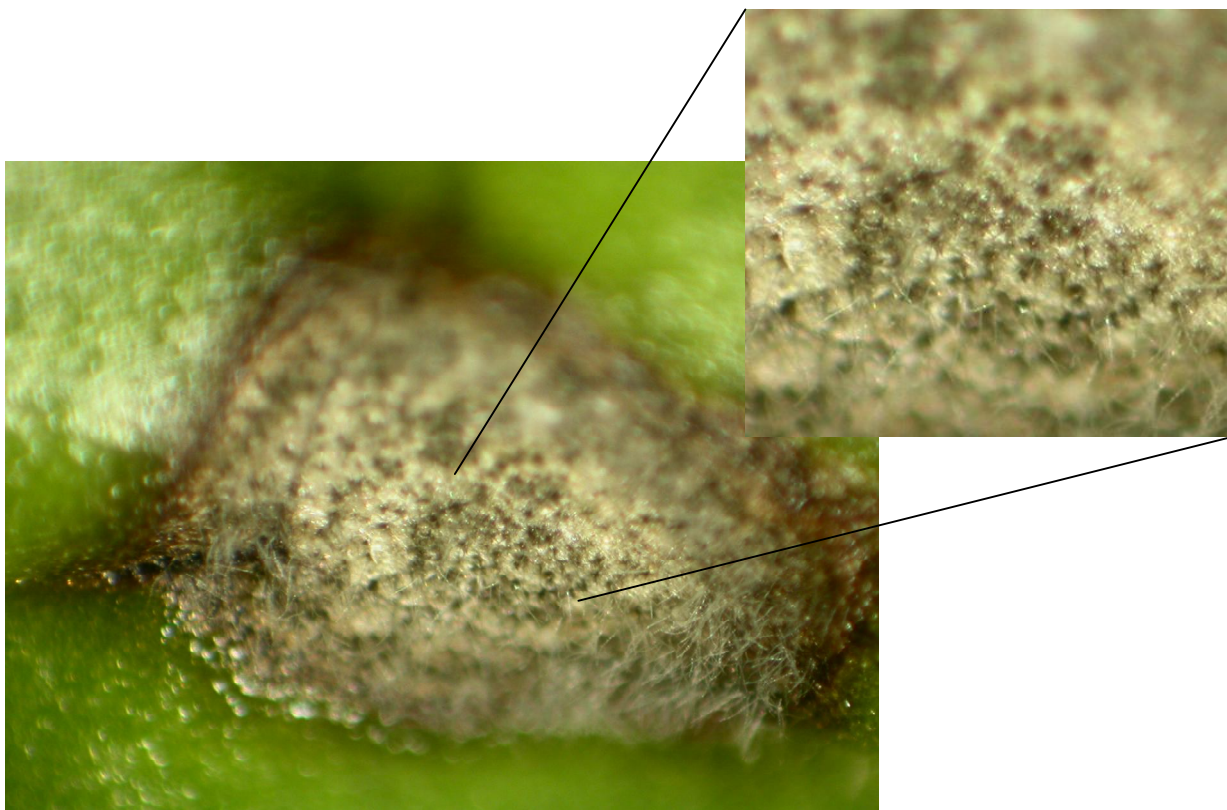
Lezije nastaju tako što se skoro istovremeno vrši kolaps ćelija u prečniku od nekoliko milimetara, nakon čega dolazi do obrazovanja karakterističnog mrko crvenog oreola (**Weiland i Koch, 2004**). Centralni deo pege je sive do svetlo mrke boje sa crnim stromama. Strome čini masa hifa koja prožima tkivo domaćina u vidu strukture koja je slična sklerociji i služi za prezimljavanje. U uslovima visoke vlažnosti, u centru lezije se obrazuje sivo pepeljasta somotasta navlaka konidiofora i konidija (**Balaž i sar., 2010**). Iako se lezije mogu povećavati u prečniku, širenje pegama zahvaćene lisne površine nastaje putem nastanka novih lezija. Na samom kraju, formiranjem velikog broja lezija i akumulacijom fitotoksina dolazi do potpunog propadanja lista (**Weiland i Koch, 2004**). Stepent hloroze i nekroze, kao i intenzitet propadanja listova zavise od prisustva fitotoksina (**Franc, 2010**). Tkivo u okviru pega često ispada pa se javlja šupljikavost lista kao sekundarni simptom (**Balaž i sar., 2010**). Na lisnim drškama i cvetonosnom stablu se javljaju izdužene i ugnute pege.

## **Životni ciklus i epidemiologija**

Životni ciklus *C. beticola* se sastoji iz većeg broja ponovljenih perioda klijanja konidija, infekcije, sporulacije, oslobađanja i rasejavanja konidija do osetljivog domaćina koji se odvijaju tokom vegetacije.

Parazit prezimljava u vidu konidija i stroma na ostacima zaraženih listova i lisnih drški (**Franc, 2010**). Pri stabilnim umerenim temperaturama i niskoj relativnoj vlažnosti konidije mogu ostati vitalne i do 8 meseci (**Pool i McKay, 1916b; Khan i sar., 2008**). Strome imaju najveći

epidemiološki značaj u održavanju vrste (**Pool i McKay, 1916b**)-Slika 2. One mogu opstati i do 2 godine, sve dok se u zemljištu nalaze ostaci obolelih biljaka.



Slika 2. Stromatične tvorevine *Cercospora beticola* u vidu crnih telašaca u okviru pege na listu (Orig.)

Nakon prezimljavanja i po nastupanju povoljnih meteoroloških uslova dolazi do sporulacije direktno iz strome prezimele u okviru zaraženih ostataka, ili se konidije obrazuju na miceliji koja prorasta iz strome (**Weiland i Koch, 2004**)-Slika 3.



Slika 3. Sporulacija *Cercospora beticola* (Orig.)

Nakon sporulacije, konidije se prenose kišnim kapima, insektima i vetrom do naličja listova osetljivog domaćina (**Pool i McKay, 1916b; Meredith, 1967; Lawrence i Meredith, 1970**). S obzirom da se na naličju nalazi najveći broj stoma, mogućnost naseljavanja parenhima lista kroz otvorene stome putem hifa *C. beticola* je najveća (**Weiland i Koch, 2004**). U literaturi su opisani i drugi načini prezimljavanja: zaraženim semenom i putem alternativnih domaćina iz rodova *Amaranthus*, *Atriplex*, *Chenopodium*, *Cycloloma* i *Plantago* (**Jacobsen i Franc, 2009**).

Nakon prodiranja, parazit se širi intercelularno u parenhimskom tkivu stoma (**Rathaiah, 1977; Steinkamp i sar., 1979**). Gljiva obrazuje toksine u blizini mesta grananja hifa, što dovodi do nekroze ćelija domaćina (**Weiland i Koch, 2004**). Na taj način gljiva obezbeđuje hranljive materije, dok nekrotirano tkivo postaje mesto formiranja svetlo mrkih konidiofora i hijalinskih, septiranih konidija (Slika 4).



Slika 4. Konidije *Cercospora beticola* (Orig.)

Konidiofore se obrazuju na stromama i prorastaju kroz stomine otvore noseći konidije koje izbijaju sa površine pege sa lica i naličja lista (**Pool i McKay, 1916b**). Usled povoljne vlažnosti, konidije su brojnije na naličju lista, osim u slučajevima kada je lice lista u senci od listova više spratnosti. Tada odlučujući efekat na obrazovanje konidija ima vlažnost, dok svetlost generalno nema uticaja na intenzitet sporulacije (**Pool i McKay, 1916a**). Parazit ima veliki potencijal razmnožavanja, jer na jednoj zaraženoj biljci može da se obrazuje 250 miliona spora (**Pool i McKay, 1916b**). Periodi smanjene relativne vlažnosti vazduha pomažu rasejavanje konidija (**Meredith, 1967**), kada konidije i konidiofore podležu naglim higroskopnim pokretima koji pomažu oslobađanje spora. Povećan broj konidija je zabeležen u periodima povećanja brzine vetra i temperature i istovremenog smanjenja relativne vlažnosti vazduha (**Lawrence i Meredith, 1970**). **Pool i McKay (1916 a, b)** su zaključili da vetar i kiša doprinose oslobađanju spora na razdaljinama do 100m. Nakon klijanja, dolazi do izduživanja infektivne hife, koja u tkivo domaćina dospeva putem otvorenih ili zatvorenih stoma, a istovremeno micelija gljive raste po lisnoj površini vođena hidrotropizmima do otvorenih stoma (**Rathaiah, 1977**). Infekcija putem stoma se odvija na temperaturama između 12 i 40 °C kada je relativna vlažnost vazduha preko 90% u trajanju od 1-22 sata. U slučaju da su stome zatvorene, micelija može izvršiti infekciju pomoću apresorije. Optimalni uslovi za klijanje konidija i infekciju su temperature od 25-27 °C i relativna vlažnost vazduha 98-100% (**Marić, 1969; Marić, 1974; Balaž i sar., 2010**).

Simptomi na listovima su uočljivi najranije 5 dana po infekciji, dok nakon 10-13 dana imaju prečnik oko 1mm i karakterističan izgled (**Steinkamp i sar., 1979**). Konidije iz primarnih

infekcija se produkuje nakon 7-21 dan zavisno od temperature, svetlosti, starosti lista i osetljivosti domaćina (**Franc, 2010**).

Alternativni put infekcije šećerne repe od *C. beticola* opisali su **Vereijssen i sar. (2004)**, koji su utvrdili da su sejanci šećerne repe, čiji je koren uronjen u suspenziju konidija, manifestovali simptome pegavosti na kotiledonima nekoliko dana nakon inokulacije. Ovo ukazuje na to da prisustvo šećerne repe potpomaže endofitni i epifitni vegetativni porast gljive, pre nego što otpočne parazitna faza.

## **Mere zaštite**

S obzirom da zaraženi ostaci šećerne repe i/ili alternativnih domaćina predstavljaju najznačajni izvor inokuluma, njihovo uništavanje prekida životni ciklus parazita i smanjuje nivo zaraze narednog osetljivog useva (**Jacobsen i Franc, 2009**). Zaoravanjem zaraženih žetvenih ostataka se ubrzava njihova razgradnja pod dejstvom vlage i zemljišnih mikroorganizama. Slično tome, plodored u trajanju 2-3 godine obezbeđuje dovoljno vremena da se unište zaraženi ostaci biljaka sa površine zemljišta u bilo kojim klimatskim uslovima.

Prostorna udaljenost od parcela na kojima je ranije gajena šećerna repa od najmanje 100m se smatra dovoljnom jer konidije *C. beticola* nisu aerodinamične i njihovo raznošenje pomoću vetra nije dovoljno efikasno (**Pool i McKay, 1916b**).

Sve mere koje doprinose podizanju vitalnosti biljaka tokom vegetacije, kao što su optimalno đubrenje i snabdevenost useva vodom, smanjuju stres i negativan uticaj bolesti (**Franc, 2010**).

Gajenje genotipova šećerne repe visokog stepena otpornosti je veoma efikasna mera za smanjenje širenja bolesti među populacijom biljaka domaćina (**Rossi, 1995**). Šećerna repa i drugi domaćini manifestuju otpornost prema ovom parazitu putem smanjenja veličine formiranih lezija, redukcije broja pega po listu i smanjenoj produkciji konidija po jedinici površine lezije (**Weiland i Koch, 2004**). U prisustvu otpornih biljaka domaćina, infektivni potencijal konidija je redukovan za 44-79%, period inkubacije od infekcije do obrazovanja pega je produžen na 12 dana, površina nekrotiranih površina je smanjena za 45%, dok je intenzitet formiranja konidija redukovan za 65%. Ipak, osetljivost domaćina ne utiče na momenat ispoljavanja simpotoma i vreme koje je potrebno da se u okviru lezija obrazuju konidije (**Rossi i sar., 2000**).

Primena fungicida je odlučujuća za uspešnu kontrolu pegavosti lista šećerne repe. U našim agroekološkim uslovima se izvodi redovno prosečno 2-4 tretiranja u zavisnosti od klimatskih uslova (**Stojšin i sar., 2008; Balaž i sar., 2010**). Najvažniji momenat za aplikaciju fungicida je neposredno pre nego što se pojave simptomi oboljenja (**Agrios, 2005**), odnosno u momentu kada se simptomi pojave na oko 5% biljaka (**Wolf i Verreet, 2002**). Ukoliko se zakasni sa prvim tretiranjem dolazi do nagomilavanja velike količine inokuluma, što kasnije tokom vegetacije može dovesti do epifitocije (**Balaž i Stojšin, 1996**)-Slika 5. Naredno tretiranje se sprovodi u skladu sa praćenjem širenja bolesti na novo lišće, kao i na osnovu meteoroloških uslova (**Balaž i sar., 2010**).





Slika 5. Epifitocija *Cercospora beticola* i retrovegetacija šećerne repe (Orig.)

Prognoza pojave pegavosti lišća šećerne repe se koristi u cilju utvrđivanja povoljnog momenta za pojavu oboljenja, na osnovu čega se proizvođačima pruža dovoljno vremena da izvrše pravovremeno tretiranje fungicidima (**Windels i sar., 1998**). Postoji veći broj modela koji na osnovu meteoroloških faktora utvrđuju povoljan momenat za sporulaciju, klijanje spora, infekciju i širenje bolesti, a samim tim procenjuju intenzitet oboljenja i daju preporuke za momenat primene fungicida (**Shane i Teng, 1984; Windels i sar., 1998; Wolf i Verreet, 2005; Khan i sar., 2007; Vereijssen i sar., 2007**). Ovi modeli prognoze su rezultirali u



sveukupnom smanjenju broja aplikacije primene fungicida, istovremeno smanjujući rizik od nastanka rezistentnosti parazita prema fungicidima i povećavajući troškove proizvodnje šećerne repe (**Weiland i Koch, 2004**).

U novije vreme je ispitano nekoliko novih načina za kontrolu *C. beticola* (**Franc, 2010**). Biološka kontrola nanošenjem preparata na bazi bakterija na površinu lista pre nastupanja povoljnih uslova za infekciju doprinosi smanjenju intenziteta oboljenja (**Bargabus i sar., 2003**). Ove mere se mogu lako integrisati sa standardnim merama nege useva i u kombinaciji sa otpornim genotipovima mogu značajno smanjiti potrebu za primenom fungicida (**Jacobsen i sar., 2004**). Takođe je dokazano da enzim lakaza, koji sadrži bakar i koji je izolovan iz bazidiomiceta, ima sposobnost da izvrši detoksikaciju cercosporina (**Caesar-TonThat, 2002**).

### **Fungicidi za suzbijanje pegavosti lista šećerne repe**

U širokom spektru mera koje seporučuju za zaštitu šećerne repe od *C. beticola* jedino fungicidi obezbeđuju efikasnu i sigurnu zaštitu i osiguravaju visok prinos i kvalitet korena (**Wolf i Verreet, 2010**). Princip integralne zaštite šećerne repe eksplicitno uključuje i primenu fungicida. Primena svih ostalih navedenih mera ne zamenjuje primenu fungicida u slučaju kada su visina i kvalitet prinosa ugroženi epidemijom bolesti (**Hoffmann, 1997**). Već duži niz godina unazad, za suzbijanje *C. beticola* se koriste protektivni i sistemični fungicidi (**Ioannidis i Karaoglanidis, 2000**) – Tabela 1.

Prvi preparati za suzbijanje *C. beticola* su bili neorganski preparati na bazi bakra, koji su uvedeni početkom XX veka (**Marić, 1974**). Početkom '60-tih godina su ih zamenili preparati

na bazi organskih jedinjenja kalaja, a nakon njih su uvedeni i benzimidazoli: benomil, tiabendazol, tiofanat metil i karbendazim (**Meriggi i sar., 2000**). Fungicidi iz hemijske grupe benzimidazola su imali odlično protektivno i kurativno delovanje prema ovom parazitu, sve do pojave rezistentnosti tokom 70-tih godina XX veka (**Karaoglanidis i Ioannidis, 2010**).

DMI fungicidi (Sterol Demethylation Inhibitors) su najbrojnija i najvažnija klasa fungicida u svetu (**Karaoglanidis i Ioannidis, 2010**). Oni su najzastupljeniji u programima zaštite od pegavosti lista šećerne repe, a imaju odlično protektivno i kurativno delovanje protiv *C. beticola* (**Brown i sar., 1986; Dahmen i Staub, 1992**). U programima zaštite od pegavosti lista šećerne repe su prisutni od kasnih '70-tih godina XX veka (**Byford, 1996; Meriggi i sar., 2000**). Najčešće se primenjuju u kombinaciji sa drugim triazolima, protektivnim fungicidima ili fungicidima iz hemijskih grupa benzimidazola i strobilurina (**Anonimus, 2013**).

Strobilurini su u programe zaštite uvedeni 1996. godine i pokazali su se kao veoma efikasni i sa povoljnim ekotoksikološkim svojstvima (**Bartlett i sar., 2002**). Svi fungicidi u okviru ove grupe imaju jedinstven mehanizam delovanja, zbog čega su prema FRAC-u (Fungicide Resistance Action Committee) u grupi visokorizičnih za pojavu rezistentnosti kod fitopatogenih gljiva (**Brent i Hollomon, 2007b**). U našoj zemlji se primenjuju samostalno, ili u kombinaciji sa triazolima (**Anonimus, 2013**).

Tabela 1. Fungicidi koji su registrovani u Srbiji za suzbijanje *C. beticola* (Anonimus, 2013)

Hemijska grupa	Aktivne materije	Delovanje	Mehanizam delovanja
<b>Nitrili izoftalne kiseline</b>	Hlorotalonil	Nesistemična, protektivno delovanje.	Sprečava glikolizu i produkciju energije
<b>Benzimidazoli</b>	Karbendazim Tiofanat metil	Sistemična, protektivno i kurativno delovanje.	Inhibira sintezu $\beta$ -tubulina.
<b>DMI fungicidi: Triazoli i imidazoli</b>	Ciprokonazol, Flusilazol Epoksikonazol Difenokonazol Propikonazol Tetrakonazol Flukvinkonazol Flutriafol Tebukonazol Prohloraz (Imidazoli)	Sistemična, protektivno, kurativno i eradikativno delovanje.	Inhibiraju sintezu ergosterola (demetilaciju u C-14).
<b>Amini: Morfolini</b>	Fenpropimorf	Sistemična, protektivno, kurativno delovanje. Akropetalno se translocira u ksilemu.	Inhibicija sinteze ergosterola (različito od DMI).
<b>Strobilurini</b>	Trifloksistrobin Azoksistrobin Pikoksistrobin Piraklostrobin	Sistemična, protektivno, kurativno i eradikativno delovanje.	Inhibira transport elektrona u respiratornom lancu.

Dostupnost i primena fungicida koji spadaju u različite hemijske grupe predstavljaju veoma važan faktor u kontroli ovog oboljenja. Različiti autori (**Georgopoulos i Dovas, 1973; Ruppel i Scott, 1974; Weiland i Halloin, 2001**) su objavili rezultate ispitivanja pojave rezistentnosti *C.beticola* na fungicide iz klase benzimidazola. Takođe je u više navrata zabeležena smanjena osetljivost i rezistentnost populacije patogena prema fungicidima iz grupa organskih jedinjenja kalaja (**Cerato i Grassi, 1983; Bugbee, 1995**) i triazola (**Karaoglanidis i sar.,**

2000). Ovakva istraživanja su navela proizvođače šećerne repe da otpočnu sa hemijskom zaštitom šećerne repe, koja se zasniva na rotaciji fungicida u cilju sprečavanja pojave rezistentnosti kod *C. beticola* prema fungicidima uopšte (Weiland i Koch, 2004).

## Pojava rezistentnosti *C. beticola* prema fungicidima

Pre uvođenja sistemskih fungicida, u hemijskoj borbi protiv fitopatogenih gljiva, prouzrokovana oboljenja gajenih biljaka, korišćeni su fungicidi koji su imali preventivno delovanje, odnosno štitili su biljku pre nego što se ostvari infekcija. Kada su 60-tih godina prošlog veka uvedeni sistemski fungicidi, u svetu je došlo do ekspanzije u njihovoj primeni zbog mogućnosti da inhibiraju rast gljive i nakon infekcije. Međutim, sve češća primena sistemskih fungicida u sve širim razmerama je dovela do pojave rezistentnosti fitopatogenih gljiva (Briere et al., 2001).

Rezistentnost prema fungicidima može da se definiše kao stabilna, nasledna adaptacija patogena koja rezultira u smanjenoj osetljivosti prema fungicidu (Gallian i sar., 2001), odnosno, koja omogućava individui u okviru populacije da preživi aplikaciju sredstava za zaštitu bilja, koji u normalnim uslovima treba da rezultira suzbijanjem štetnog organizma (Brent i Holloomon, 2007a). Smanjena osetljivost, odnosno rezistentnost *C. beticola* je registrovana kod nekoliko grupa fungicida uključujući: benzimidazole (Georgopoulos i Dovas, 1973; Marić i sar., 1976), fungicide na bazi organokalajnih jedinjenja (Giannopolitis, 1978; Bugbee, 1996; Campbell i sar., 1998), DMI fungicide (Balaž i sar., 1999; Karaoglanidis i sar., 2000) i strobilurine (Kirk i sar., 2012). Rezistentnost prema

benzimidazolima i fungicidima na bazi organokalajnih jedinjenja je zabeležena u većini regiona gde se gaji šećerna repa (**Hanson, 2010**), dok su rezistentnost prema DMI fungicidima i strobilurinima zabeležene u pojedinim područjima gajenja šećerne repe (**Kirk i sar., 2012**).

Pojava rezistentnosti je uslovljena mutacijama koje patogenom mikroorganizmu omogućavaju da izbegnu dejstvo fungicida. Takve mutacije ne povećavaju sposobnost patogena da preživi u prirodnim uslovima, ali omogućavaju njegov opstanak u uslovima visokog selekcionog pritiska koji se stvara prilikom hemijske zaštite useva. Smatra se da je u prirodnim uslovima sredine uvek prisutan određeni deo populacije patogena koji poseduje prirodnu otpornost na određene fungicide. S intenzivnom i učestalom primenom istog fungicida, osetljivi deo populacije biva uništen, dok otporni predstavnici preživljavaju i u odsustvu konkurencije, postaju dominantni (**Brent i Hollomon, 2007a**).

Mehanizam rezistentnosti na fungicide je fenomen koji je najčešći predmet ispitivanja. Do danas je u potpunosti ispitan mehanizam rezistentnosti kod fungicida iz grupe benzimidazola, karboksamida, fosforotiolata, dikarboksimida i strobilurina. Kod fungicida koji inhibiraju sintezu ergosterola, odnosno, demetilaciju u C-14 (DMI), postoji saznanje o 4 osnovna mehanizma rezistentnosti gljive (**Karaoglanidis i Ioannidis, 2010**). Ipak, velike nepoznanice još uvek postoje na ovom polju kada su u pitanju grupe fungicida koje se odavno primenjuju, ali i u slučaju novijih fungicida kod kojih dolazi do pojave ukrštene rezistentnosti (cross-resistance). Mehanizmi rezistentnosti koji su do danas poznati su: promena u biohemijskoj strukturi mesta delovanja fungicida, povećanje produkcije ciljanog proteina, razvoj alternativnog metaboličkog puta koji obilazi mesto delovanja fungicida, metabolička

razgradnja fungicida, kao i izbacivanje fungicida putem transporta proteina koji pokreće ATP-aza (**Brent i Hollomon, 2007a**). Najrasprostranjeniji mehanizam rezistentnosti je promena biohemijske strukture mesta delovanja. Ova pojava može objasniti zašto kod ranije korišćenih, nespecifičnih preparata nema problema sa pojavom rezistentnosti. Naime, kada ovi preparati prodru u ćeliju gljive inhibiraju aktivnost enzima i imaju veći broj mesta delovanja. Da bi se razvila rezistentnost kod ovih preparata moralo bi doći do simultanih promena na svim mestima delovanja, a šanse za tako nešto su veoma male. Pojedini slučajevi pojave rezistentnosti kod ovih preparata posledica su delovanja nekih drugih mehanizama koji ne obuhvataju promene na mestima delovanja. Kao suprotnost ovim preparatima su današnji moderni fungicidi koji deluju na samo jedno mesto i nazivaju se i specifičnim fungicidima. Stoga, kod njih, mutacija samo jednog gena može prouzrokovati promenu na mestu delovanja tako da postane otporan na dejstvo fungicida. Razvojem metoda molekularne genetike na bazi lančane reakcije polimeraze (PCR, polymerase chain reaction) omogućena je detekcija i analiza gena koji uslovljavaju rezistentost. Generalno posmatrano, nakon primene sistemskih fungicida češće dolazi do pojave rezistentnosti, nego što je slučaj kod kontaktnih, odnosno preventivnih (**Brent i Hollomon, 2007b**).

Razvojem rezistentnosti se ozbiljno ugrožava mogućnost uspešnog suzbijanja fitopatogenih gljiva. Problem se pogoršava ukoliko je rezistentnost nepovratnog karaktera, višestruka i ukrštena. Osim nemogućnosti dalje primene takvih fungicida, dolazi i do povećanja troškova sinteze novih preparata, pa samim tim i do povećanja troškova suzbijanja ciljanog organizma (**Ishii, 2006; Hanson, 2010**).

## ***Rezistentnost prema benzimidazolima***

Fungicidi na bazi benzimidazola ispoljavaju sistemičnu aktivnost u suzbijanju gljiva iz razreda *Ascomycetes* i *Basidiomycetes* (**Karaoglanidis i Ioannidis, 2010**). U našoj zemlji su za suzbijanje *C. beticola* registrovane aktivne materije karbendazim i tiofanat metil (Tabela 1), dok je prva primena ovih fungicida u našoj zemlji podrazumevala aktivnu materiju benomil (**Marić i sar., 1976**). Benzimidazoli su bili prvi sistemični preparati korišćeni u zaštiti šećerne repe od *C. beticola* uvedeni u primenu '70-tih godina prošlog veka (**Dovas i sar., 1976**). Nakon što su pokazali odlično protektivno i kurativno delovanje kako u polju, tako i u zaštićenom prostoru (**Solel, 1970**), s njihovim uvođenjem upotreba ostalih preparata je prekinuta (**Karaoglanidis i Ioannidis, 2010**). Nakon dve godine isključive primene benomila u zaštiti od *C. beticola* u Grčkoj, registrovana je pojava visokog intenziteta oboljenja uprkos redovnoj primeni ovog fungicida (**Georgopoulos, 1982**). Nakon prvog slučaja pojave rezistentnosti prema benzimidazolima u Grčkoj (**Georgopoulos i Dovas, 1973**), rezistentnost je detektovana i u drugim zemljama: Italiji (**D'Ambra i sar., 1974**), SAD (**Ruppel i Scott, 1974**), teritoriji bivše Jugoslavije (**Marić i sar., 1976; Gavran, 1991**), Japanu (**Uesugi, 1979**) i Indiji (**Pal i Mukhopadhyay, 1984**).

Preparati na bazi benzimidazola ispoljavaju svoju fungicidnu aktivnost tako što se vezuju za  $\beta$ -tubulin kod gljiva, ometaju mitozu i formiranje citoskeleta (**Davidse, 1986**). Mehanizam rezistentnosti prema fungicidima na bazi benzimidazola kod *C. beticola* je uslovljen mutacijom  $\beta$ -tubulin gena, što umanjuje ili onemogućava vezivanje benzimidazola za  $\beta$ -tubulin (**Davidson i sar., 2006**). U molekularnim analizama izolata rezistentnih prema

benzimidazolima je utvrđeno postojanje mutacije na kodonu 198  $\beta$ -tubulin gena (sekvenca GAG kod osetljivih izolata je zamenjena sa GCG kod rezistentnih). Pored navedene, kod *C. beticola* su utvrđene i druge mutacije koje utiču na nivo osetljivosti gljive prema fungicidima. **Trkulja i sar. (2013)** su detektovali mutacije na kodonu 167 kod izolata koji su slabo ili umereno rezistentni prema ovoj grupi fungicida. Sposobnost zadržavanja svojstava (fitnes) izolata koji ispoljavaju rezistentnost prema benzimidazolima se smatra vrlo stabilnom osobinom, odnosno udeo rezistentnih izolata se veoma sporo smanjuje, čak i u potpunom odsustvu selekcionog pritiska fungicida (**Karaoglanidis i Ioannidis, 2010**).

### **Rezistentnost prema DMI fungicidima**

DMI fungicidi, koji inhibiraju sintezu ergosterola, odnosno, demetilaciju u C-14 predstavljaju najveću i najznačajniju grupu fungicida na svetu u zaštiti šećerne repe od pegavosti lista koju prouzrokuje *C. beticola* (**Siegel, 1981; Karaoglanidis i Ioannidis, 2010**). Primenjuju se od '70-tih godina prošlog veka (**Meriggi i sar., 2000**) i imaju odlično protektivno i kurativno dejstvo protiv *C. beticola* (**Dahmen i Staub, 1992**). Trenutno je u Srbiji registrovano 10 aktivnih materija iz grupe DMI fungicida, odnosno hemijskih grupa triazola i imidazola (Tabela 1).

Prva pojava smanjene osetljivosti *C. beticola* prema DMI fungicidima registrovana je u Grčkoj krajem '90-tih godina prošlog veka (**Karaoglanidis i sar., 2000**). Ispitivane populacije gljive iz tri regiona gajenja šećerne repe su pokazale kontinuiranu promenu osetljivosti prema DMI



fungicidima, od veoma osetljivih do onih sa značajno smanjenom osetljivošću, što je ukazalo na poligeno kontrolisanu rezistentnost (**Karaoglanidis i sar., 2002**).

Iako su DMI fungicidi specifični po mestu delovanja, što ukazuje na postojanje visokog rizika od pojave rezistentnosti, oni se nalaze u grupi fungicida sa umerenim rizikom od pojave rezistentnosti (**Georgopoulos i Skylakakis, 1986; FRAC, 2013**). Poznata su dva do sada opisana mehanizma pojave rezistentnosti prema DMI kod *C. beticola*: a) mutacije u C-14  $\alpha$ -demetilaza genu (*CYP51*) i b) prekomerna ekspresija *CYP51* gena (**Ma i Michailides, 2005**). **Nikou i sar. (2009)** su ukazali da je prekomerna ekspresija C-14  $\alpha$ -demetilaza gena (*CYP51*) moguć mehanizam rezistentnosti *C. beticola* prema DMI fungicidima.

Smatra se da je fitnes izolata *C. beticola* koji su rezistentni prema DMI fungicidima manji u odnosu na osetljivu populaciju gljive (**Karaoglanidis i Ioannidis, 2010**).

### ***Rezistentost prema strobilurinima***

Strobilurini (QoI fungicidi) su relativno nova grupa fungicida, koji imaju mehanizam delovanja da inhibiraju mitohondrijalno disanje vezujući se za ubikvinol oksidazu (Qo) na citohromu b (**Bartlett i sar., 2002**). U našoj zemlji je za suzbijanje *C. beticola* registrovano ukupno četiri aktivne materije koje se primenjuju samostalno ili u kombinaciji sa triazolima (Tabela 1).

Strobilurini predstavljaju grupu fungicida kod koje postoji visok rizik od pojave rezistentnosti (**Ma i sar., 2003; FRAC, 2013**). Prvi slučaj rezistentnosti kod poljske populacije *C. beticola* je zabeležen 2011. godine u SAD (**Kirk i sar., 2012**) nakon propusta u kontroli pegavosti lista

šećerne repe na poljima tretiranim strobilurinima tokom niza godina. Rezistentost prema Qol fungicidima je veštački indukovana ranije, kada je potvrđeno da mutacije koje se javljaju kod rezistentnih izolata podrazumevaju zamenu glicina s alaninom na poziciju 143 u aminokiselinskom lancu (**Malandrakis i sar., 2011**), što je slučaj i kod drugih fitopatogenih gljiva (**Ma i Michailides, 2005**).

Kada su u pitanju *in vitro* ispitivanja osetljivosti izolata *C. beticola* prema strobilurinima, primenjuju se metode koje se zasnivaju na merenju inhibicije klijanja spora (**Secor i sar., 2010**) ili određivanju redukcije porasta micelije (**Malandrakis i sar., 2011**). S obzirom na činjenicu da gljive u prisustvu strobilurina u podlozi imaju sposobnost korišćenja alternativne oksidaze (AOX), što omogućava i osetljivim izolatima da ostvaruju porast micelije na podlozi sa dodatim fungicidom, u *in vitro* ispitivanjima se u podlogu dodaje rastvor salicilhidroksamične kiseline (salicylhydroxamic acid - SHAM). Ova kiselina inhibira aktivnost AOX tokom ispitivanja rezistentnosti prema strobilurinima (**Avila-Adame i Köller, 2002; Avila-Adame i Köller, 2003**), inhibirajući porast micelije osetljivih izolata, te se na taj način otkriva samo ona rezistentnost koja je uzrokovana mutacijom u citohromu b (**Larson, 2004**).

### ***Ukrštena rezistentnost***

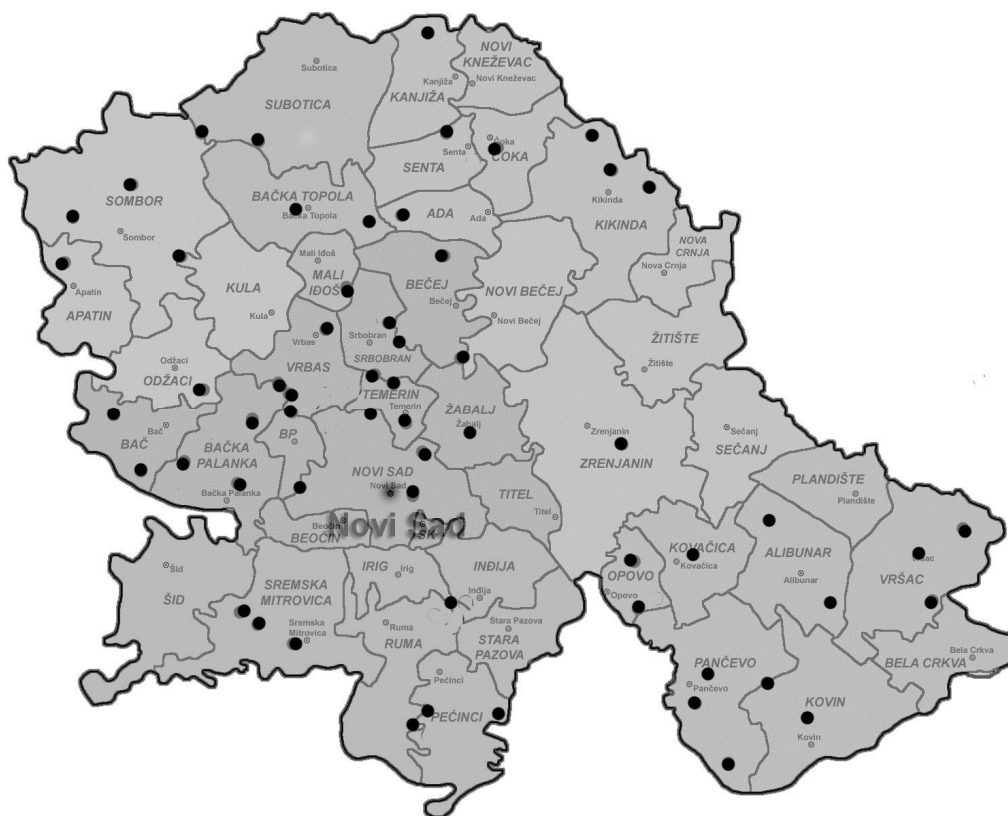
Ukrštena rezistentnost predstavlja rezistentnost koja se kod fitopatogenih gljiva javlja prema dva ili više fungicida i uslovljena je istim genetskim faktorima (**Georgopoulos, 1977**). Pojava ukrštene rezistentnosti jednog fitopatogena prema nizu različitih fungicida je u korelaciji sa postojanjem zajedničkog mehanizma delovanja koji ispitivani fungicidi imaju (**Brent i Hollomon, 2007b**). Ukrštena rezistentnost prema pojedinim DMI fungicidima je dobro

proučena osobina i javlja se između svih predstavnika ove hemijske grupe fungicida (**Gisi i sar., 2005**). Ipak, uprkos opšteprihvaćenom stavu da se ukrštena rezistentnost javlja između predstavnika DMI fungicida, dobro je poznato da postoji varijabilnost u obrascima ukrštene rezistentnosti između pojedinih parova fungicida (**Köller i Wubben, 1989; Kendall i sar., 1993**).

# MATERIJAL I METOD RADA

## *Uzorkovanje listova šećerne repe*

Listovi šećerne repe sa simptomima pegavosti su prikupljeni tokom 2007. godine sa ukupno 60 lokaliteta u Vojvodini (Slika 6) sa poznatom istorijom primene fungicida iz grupa benzimidazola, DMI fungicida i strobilurina u prethodne 3 godine (Tabela 2). Za svaku uzorkovanu parcelu odabran je po jedan izolat za dalja ispitivanja.



Slika 6. Lokaliteta sa kojih su prikupljeni uzorci listova šećerne repe

Pored izolata sa šećerne repe, uzorkovani su i listovi cvekle i blitve sa simptomima pegavosti lista, u cilju prikupljanja referentnih izolata sa lokaliteta u kojima nikada nisu primenjivani fungicidi.

Tabela 2. Spisak izolata sa lokalitetima i istorijom primene triazola, strobilurina i benzimidazola u prethodne 3 godine

Redni broj	Lokalitet	Istorija primene fungicida		
		Triazoli	Strobilurini	Benzimidazoli
1	Kač	+	+	+
2	Temerin	+	+	+
3	Bečej	+	+	+
4	Čurug	+	+	+
5	Gložan	+	+	+
6	Bački Maglić	+	+	+
7	Zmajevu	+	+	+
8	Žabalj	+	+	+
9	Sirig	+	+	+
10	Srbobran	+	+	+
11	Turija	+	+	+
12	Čenej	+	+	+
13	Dunavac	+	-	+
14	Dunavac	+	+	+
15	Vrbas	+	+	+
16	Omoljica	+	-	+
17	Vršac	+	-	+

18	Vršac	+	+	+
19	Kovin	+	-	+
20	Banatski Karlovac	+	-	+
21	Izbište	+	-	+
22	Kovačica	+	-	+
23	Besni Fok	+	-	+
24	Opovo	+	+	+
25	Despotovo	+	+	+
26	Kucura	+	+	+
27	Bački Gračac	+	+	+
28	Sivac	+	+	+
29	Sombor	+	+	+
30	Apatin	+	+	+
31	Kupusina	+	+	+
32	Vajska	+	+	+
33	Čelarevo	+	+	+
34	Ratkovo	+	+	+
35	Kisač	+	+	+
36	Obrovac	+	+	+
37	Karavukovo	+	+	+
38	Kraljevci	+	-	+
39	Beška	+	-	+
40	Indija	+	-	+
41	Lačarak	+	-	+
42	Golubinci	+	+	+
43	Popinci	+	+	+
44	Žarkovac	+	-	+
45	Subotište	+	-	+

46	Veliki Radinci	+	-	+
47	Surčin	+	+	+
48	Sremska Mitrovica	+	+	+
49	Prhovo	+	+	+
50	Kikinda	+	-	+
51	Mokrin	+	-	+
52	Banatsko Veliko Selo	+	-	+
53	Aleksa Šantić	+	-	+
54	Bačko Dobro Polje	+	+	+
55	Gornji Breg	+	+	+
56	Senta	+	+	+
57	Senta	+	-	+
58	Feketić	+	+	+
59	Pačir	+	+	+
60	Zrenjanin	+	+	+
61	Blitva, Sremska Kamenica	-	-	-
62	Cvekla, Futog	-	-	-

'+' - fungicidi primenjivani u poslednje 3 godine

'-' - fungicidi nisu primenjivani u poslednje 3 godine

## ***Kolekcija izolata i dobijanje čistih kultura***

Izolacija patogena je urađena po modifikovanoj metodi koju su opisali **Geogopoulos i Dovas (1973)**. Prikupljeni listovi šećerne repe su isprani vodom i celi ili njihovi fragmenti, sa karakterističnim pegama su postavljeni na navlaženu filter hartiju u Petri kutije i inkubirani na 25-26 °C u trajanju od 24-36 časova u cilju izazivanja sporulacije patogena u okviru pega. Monosporijalne izolacije su urađene prihvatanjem pojedinačnih konidija pomoću sterilne entomološke igle pod stereo mikroskopom i prebacivanjem na Krompir dekstrozni agar-KDA (PDA, Carl Roth GmbH) sa dodatkom streptomycin sulfata (1,5 mg/L). Nakon 10 dana, izolati su presejavani na zakošeni KDA u epruvete i čuvani u frižideru na 4 °C. Izolati su obeležavani kombinacijom slova i brojeva, gde su slova inicijali vrste *C. beticola*, brojevi označavaju izolate prema hronološkom redosledu po kojem su izolovani.

## ***Morfološke i odgajivačke karakteristike***

Praćenje brzine porasta i odgajivačkih karakteristika izolata je vršeno na tri vrste podloge: krompir dekstrozni agar-KDA (Potato Dextrose Agar-PDA, Carl Roth GmbH), sladni agar-SA (Malt Extract Agar-MEA, Lab M Ltd.), Čapekovej podlozi-CZ (Czapek Dox Agar) (Smith, 1954). Fragmenti podloge prečnika 5mm sa micelijom gljive starom 7 dana su postavljeni na navedene podloge i okretani su micelijom ka podlozi. Inkubirani su tokom 10 dana na 25 °C kada je izmeren prečnik micelije i opisane morfološke karakteristike kolonija primenom modifikovane skale **Moretti i sar (2003)** – Tabela 3. Prečnik kolonija je računat kao prosek dve



ose pod pravim uglom. Za svaki izolat su opisane kolonije u 6 ponavljanja (tri fragmenta u po dve Petri kutije prečnika 90mm).

Tabela 3. Ocene morfoloških karakteristika kolonija *Cercospora beticola*.

<b>Boja micelije</b>	<b>Oznaka</b>	<b>Tekstura micelije</b>	<b>Oznaka</b>	<b>Ostale osobine kolonije</b>	<b>Oznaka</b>
<b>Tamno siva do crna</b>	A	<b>Granulozna</b>	a	<b>Radijalna zoniranost</b>	*
<b>Svetlo siva</b>	B	<b>Vatasta</b>	b	<b>Talasast obod kolonije</b>	**
<b>Svetlo siva sa tamno sivim obodom</b>	C	<b>Praškasta</b>	c		
<b>Bela</b>	D	<b>Kožasta</b>	d		
<b>Svetlo maslinasto siva</b>	E	<b>Pahuljasta, vunasta</b>	e		
<b>Crna</b>	F	<b>Izbrazdana</b>	f		
<b>Tamno maslinasto siva</b>	G	<b>Somotasta</b>	g		

## ***In vitro* testiranja osetljivosti prema fungicidima**

Određivanje kvalitativne osetljivosti izolata *C. beticola* se zasnivalo na testiranju porasta izolata na podlogama sa diskriminativnom koncentracijom fungicida po metodi **Karaoglanidis i sar., 2003**. Diskriminativna koncentracija za sve testirane fungicide je predstavljala onu koncentraciju na kojoj su testirani izolati bili jasno podeljeni u dve grupe: one čiji je porast inhibiran i one koje nisu inhibirane prisustvom fungicida u podlozi (**Jo i sar., 2006**). U cilju određivanja diskriminativne koncentracije korišćeno je 5 referentnih izolata *C. beticola* izolovanih sa cvekle iz okućnica u Futogu (CB 581 i CB 582) i blitve iz Sremske Kamenice (CB 586, CB 587 i CB 588). Ovi izolati su prikupljeni sa lokaliteta na kojima nikad nije primenjivan ni jedan od ispitivanih fungicida.

Testiranje osetljivosti izolata prema svim ispitivanim fungicidima je vršeno na isti način. Rastvor fungicida je dodavan u sterilisanu i prohlađenu podlogu u sterilnim uslovima. Fragmenti podloge sa micelijom izolata starim 7-10 dana su postavljeni na KDA podlogu micelijom okrenutom ka podlozi radi uspostavljanja direktnog kontakta micelije sa fungicidom. Svaka kombinacija fungicid-izolat je ponovljena 3 puta u Petri kutijama prečnika 90mm u koje su postavljana po 3 fragmenta podloge sa micelijom (prečnika 5mm) okrenutom ka podlozi. Za kontrolu je korišćena KDA bez dodatih fungicida. Prosečan prečnik kolonije je meren nakon 4 dana inkubacije na 25-26 °C, a izveden je na bazi proseka dva prečnika kolonije pod pravim uglom. Od proseka je oduzet prečnik fragmenta podloge sa micelijom. Rastvori fungicida su pripremani u sterilnoj vodi, dok je tehnički čist azoksistrobin dispergovan u metanolu. Autoklavirana KDA podloga je prohlađena do 40 °C, nakon čega su dodati rastvori

fungicida odgovarajućih koncentracija u zavisnosti od preparata (Tabela 3) (**Weiland i Halloin, 2001; Karaoglanidis i sar., 2003**).

Osetljivost izolata prema karbendazimu iz grupe benzimidazola je ispitana na seriji koncentracija od 1, 2, 4, 5, 8, 10, 16, 20, 32 i 50 µg/mL. U sterilisanu i prohlađenu hranljivu podlogu je dodavana je odgovarajuća količina rastvora preparata Galofungin (500g/L karbendazima, Galenika Fitofarmacija) koncentracije 5 mg/ml.

Za testiranje osetljivosti izolata prema fungicidima iz grupe triazola (flutriafola i tetraokonazola) primenjene su koncentracije od: 0.3, 0.6, 1.25, 2, 4, 8 i 16 µg/mL. Hranljivoj podlozi je dodavan radni rastvor komercijalnih formulacija: Takt (125g/L flutriafola, Herbos, Hrvatska) i Eminent 125 ME (125 g/L tetraokonazola, MAGAN Agrochemicals).

Azoksistrobin iz grupe strobilurina je testiran na 3 koncentracije: 0.01, 0.1 i 1 µg/mL. Svaka koncentracija fungicida je testirana uz dodatak 1mM salicilhidroksamične kiseline (SHAM). U podlogu je dodavan rastvor tehničkog azoksistrobina i SHAM u metanolu. Za negativnu kontrolu u podlogu nije dodavan fungicid, već samo salicilhidroksamična kiselina u koncentraciji 1mM.

Dobijeni podaci su korišćeni za računanje relativnog porasta micelije (RP) za svaku kombinaciju fungicida i izolata primenom formule:

$$RP [\%] = \frac{A}{B} \times 100,$$

gde je RP relativan porast micelije, A je prosek porasta micelije na podlozi sa dodatkom fungicida, dok je B prosek porasta micelije na podlozi bez fungicida (negativna kontrola).

Dobijeni relativni porast micelije (RP) je korišćen za računanje koncentracije koja inhibira 50% porasta micelije za svaki fungicid u odnosu na kontrolu. Vrednost  $EC_{50}$  je dobijena regresiranjem RP vrednosti u odnosu na  $\text{Log}_{10}$  testiranih koncentracija fungicida za svaki izolat posebno **(Karaoglanidis i Thanassoulopoulos, 2003)**. Prosečna  $EC_{50}$  referentnih izolata je korišćena kao diskriminativna koncentracija u cilju ispitivanja kvalitativne osetljivosti ostalih izolata *C. beticola* (Tabela 4). Faktor rezistentnosti (FR) je računat za svaki od izolata iz grupe referentnih kao odnos  $EC_{50}$  posmatranog i najosetljivijeg izolata **(Karaoglanidis i sar., 2002)**.

Na osnovu vrednosti relativnog porasta micelije, svi izolati su podeljeni u četiri grupe: i) osetljivi (RP < 20%); ii) sa smanjenom osetljivošću (RP = 20-39.9%); iii) umereno rezistentni (RP = 40-69.9%) i iv) visoko rezistentni (RP ≥ 70%).

Ukrštena rezistentnost izolata prema fungicidima iz grupe triazola (flutriafol i tetraokonazol) je merena stavljanjem u korelaciju  $\text{Log } EC_{50}$  vrednosti parova za navedene fungicide kod izolata referentne populacije **(Karaoglanidis i Thanassoulopoulos, 2003)**.

Tabela 4. Spisak fungicida i aktivnih materija koje su korišćene za određivanje kvalitativne osetljivosti izolata *C. beticola*

<b>Aktivna materija</b>	<b>Fungicid(sadržaj a.m.)</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Diskriminativna koncentracija u podlozi</b>
<b>Flutriafol</b>	Takt (125 g/L)	Herbos, Hrvatska	1.25 µg/mL
<b>Karbendazim</b>	Galofungin (500 g/L)	Galenika Fitofarmacija, Srbija	5 µg/mL
<b>Tettrakonazol</b>	Eminent (125 g/L)	Magan	0.6 µg/mL
<b>Azoksistrobin</b>	Tehnički čista aktivna materija	Nufarm GmbH&Co	0,01 µg/mL*

\*U cilju inhibicije alternativne oksidaze, u podlogu je pored fungicida dodato 1mM SHAM.

## **Molekularne analize**

Pošto je osetljivost fungicida utvrđena u *in vitro* testovima određivanja kvalitativne i kvantitativne osetljivosti, odabrano je 19 izolata sa različitim nivoom osetljivosti prema flutriafolu u cilju analize C-14 alfa demetilaza gena, dok je 16 izolata odabrano za analizu  $\beta$ -tubulin gena, u cilju identifikacije mutacija koje prouzrokuju rezistentnost prema karbendazimu.

### **Ekstrakcija DNK**

Za ekstrakciju DNK su korišćeni izolati koji su rasli na KDA podlozi u trajanju od 10 dana na temperaturi od 25-26°C. Micelija je sastrugana sa površine čvrste hranljive podloge i za ekstrakciju je korišćeno po 300-900mg micelije od svakog ispitivanog izolata.

DNK je ekstrahovana prateći 3 protokola: A) **Saghai-Marooft i sar (1984)**, B) **Weiland (1997)** i C) **Cenis (1992)** sa određenim modifikacijama (Tabela 5).

Tabela 5. Protokoli za izolaciju DNK iz micelije *Cercospora beticola*: A) **Saghai-Marooft i sar (1984)**, B) **Weiland (1997)** i C) **Cenis (1992)**.

<b>Koraci</b>	<b>Protokol za izolaciju A</b>			<b>Protokol za izolaciju B</b>			<b>Protokol za izolaciju C</b>		
<b>1</b>	0,5-0,7g	micelije	je	0,3-0,6g	micelije	je	0,5-0,9g	micelije	je
	homogenizovano		u	homogenizovano		u	homogenizovano		u

Koraci	Protokol za izolaciju A	Protokol za izolaciju B	Protokol za izolaciju C
	tečnom azotu.	tečnom azotu.	ekstrakcionom puferu.
2	Dodato je 600µl CTAB ekstrakcionog pufera po 0,5g micelije, koji je prethodno zagrejan na 65 °C.	Dodato je 600µl ekstrakcionog pufera po 0,5g micelije i lagano promešano.	Dodato je 20µl proteinaze (20mg/ml) i inkubirano 30 min na 65 °C.
3	Mešavina je inkubirana na 65 °C u trajanju od 30 minuta.	Dodat je 1ml fenol:hloroform:IAA (25:24:1) po 0,5g micelije.	Dodato je 20µl RNaze (10mg/ml)
4	Nakon hlađenja, dodat je 1 vol hloroform : IAA (24:1).	Vorteks i centrifugiranje 15 min na sobnoj temperaturi.	Mešavina je inkubirana 10 min na 65 °C.
5	Vorteks i centrifugiranje 10 min na sobnoj temperaturi.	Supernatant je prebačen u čiste ependorf tube i dodat je 0,6 vol izopropanola.	Dodato je 400-450µl 3M Na acetata (pH 5,2).
6	Supernatant je prebačen u čiste ependorf tube i dodat je 1 vol izopropanola.	Mešavina je lagano promešana i inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi.	Mešavina je inkubirana 10 min na -20 °C.
7	Mešavina je lagano promešana i centrifugirana 10 min na sobnoj temperaturi.	Centrifugiranje 15 min na 4 °C.	Centrifugiranje 20 min na sobnoj temperaturi.

Koraci	Protokol za izolaciju A	Protokol za izolaciju B	Protokol za izolaciju C
8	Dobijen pelet je ispran sa 800µl 70% etanola.	Pelet je ispran sa 800µl 95% etanola.	Supernatant je prebačen u čiste ependorf tube i dodat je 1 vol izopropanola.
9	Pelet je osušen i dodato je 40µl TE pufera sa 20µg/ml RNaze.	Pelet je osušen i rastvoren u 30-50µl TE pufera sa 20µg/ml RNaze.	Rastvor je inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi.
10	Pelet je ostavljen da se rastvori 10 min na 65 °C.	-	Centrifugiranje 20 min na sobnoj temperaturi.
11	-	-	Pelet je ispran sa 500µl 70% etanola.
12	-	-	Pelet je osušen i rastvoren u 50µl TE pufera.

U protokolima A i B, micelija sa površine čvrste hranljive podloge je homogenizovana u tečnom azotu. Prva modifikacija je izvršena na drugom koraku, gde je dodato 600µl ekstrakcionog pufera (Tabela 6) po 0,5g micelije. Dalje su oba protokola praćena bez modifikacija. Ekstrahovana DNK je rastvorena u 30-50 µl TE pufera. Prema protokolu C (Cenis, 1992), homogenizacija micelije je urađena u ekstrakcionom puferu (Tabela 6) na sobnoj temperaturi. Da bi se poboljšalo prečišćavanje izolovane DNK, prilikom koraka od 2 do 5 dodate su proteinaza i RNaza.



Tabela 6. Ekstrakcioni puferi za izolaciju DNK iz micelije *Cercospora beticola*: A) **Saghai-Marooft i sar (1984)**, B) **Weiland (1997)** i C) **Cenis (1992)**.

Pufer za ekstrakciju A	Pufer za ekstrakciju B	Pufer za ekstrakciju C
0,1 M TRIS (pH 7,5)	0,1 M TRIS (pH 8)	0,2 M TRIS (pH 8,5)
10 mM EDTA	20 mM EDTA	25 mM EDTA
0,7 M NaCl	0,5 M NaCl	0,25 M NaCl
1% CTAB (10%)	1% SDS (10%)	1% SDS (10%)
0,1 mg/ml proteinaze K	0,075mg/ml proteinaza K (20mg/ml)*	
1% 2-merkaptoetanol*		

\* Dodato neposredno pre upotrebe.

Koncentracija izolovane DNK je određena vizuelizacijom na 1% agaroznom gelu u 0,5xTBE puferu sa dodatkom etidijum bromida. Kao standard je korišćena DNK  $\lambda$  faga u koncentracijama od 25, 50, 100 i 250 ng. Vizuelizacija gela je urađena pod UV svetlom.

Čistoća i koncentracija DNK je određena spektrofotometrijski (Ultraspec 2000 Pharmacia Biotech). Vrednosti optičke gustine (optical density-OD) su očitane na talasnim dužinama od 230, 260 i 280 nm. Kvalitet izolovane DNK je takođe potvrđena putem PCR reakcije sa univerzalnim prajmerima U (5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGCTA-3') i U2 (5'-AATTTGC GCGCCTGCTGCCTTCCTT-3'), koji su specifični za 18S rRNK, deo male ribozomalne

subjedinice. Praćen je sledeći protokol: denaturacija 2 min na 95 °C, zatim 35 ciklusa denaturacije na 95 °C – 25 sek, vezivanje prajmera na 60 °C - 30 sek i ekstenzija na 68 °C u trajanju od 45 sek. Krajnja ekstenzija odvijala se 10 min na 68 °C. PCR produkti su razdvojeni na 1% agaroznom gelu, dok je dužina fragmenta utvrđena poređenjem sa 100 bp DNK markerom (Fermentas).

## **CAPS markeri**

U cilju pronalaženja mutacije koja ukazuje na pojavu rezistentnosti izolata *C. beticola* prema DMI fungicidima, korišćeni su specifični prajmeri CYP51RT-F (5'-AACTCCAAATTGATGGAGCA-3') i CYP51RT-R (5'-CGGCTAGCAGTGTAATGGT-3') u cilju umnožavanja fragmenta gena za C-14 alfa demetilazu (**Nikou i sar., 2009**). Umnožavanje ciljanog fragmenta je započelo denaturacijom na 94 °C u trajanju od 4 min, nako čega je usledilo 38 ciklusa: denaturacija 40 sek na 94 °C, vezivanje prajmera 35 sek na 52 °C i izduživanje 45 sek na 72 °C. Finalna ekstenzija na 72 °C je trajala 10 min.

Prajmeri Bt512F (5'-CCAGCTTTTCCGCCAGACAAC-3') i Bt922R (5'-ACGGCACCATGTTCACGGCAAGC-3') su primenjeni u cilju umnožavanja fragmenta  $\beta$ -tubulin gena u kojem je lokalizovana mutacija koja se javlja kao posledica rezistentnosti prema benzimidazolima (**Davidson i sar., 2006**). Umnožavanje ciljanog fragmenta se sastojalo od: inicijalne denaturacije na 94 °C u trajanju od 4 min, zatim 38 ciklusa denaturacije na 94 °C u trajanju od 40 sek, anilacije 40 sek na 62 °C i ekstenzije u trajanju od 1 min na 72 °C. Finalna ekstenzija na 72 °C je trajala 10 min.

PCR reakcije su izvedene u ukupnoj zapremini od 25  $\mu$ l koja je sadržala: 30 ng uzorka DNK ispitivanih izolata, 2.5  $\mu$ l pufera, 0.2 mM svakog dNTP-a, 2.5 mM  $MgCl_2$ , 2 jedinice Taq polimeraze (Fermentas) i 0.25  $\mu$ M svakog prajmera (Metabion) u TPersonal i T1 termalnom PCR amplifikatoru (Biometra). PCR produkti su razdvojeni na 1% agaroznom gelu sa dodatkom 0.005% etidijum bromida, dok je vizuelizacija umnoženih fragmenata urađena pod UV svetlom.

Restrikcioni enzim Alw26I (BsmAI, Fermentas) je korišćen u otkrivanju mutacije na C-14 alfa demetilaza genu (**Nikou i sar., 2009**). Sekvence gena za  $\beta$ -tubulin osetljivog (GenBank access.no. AY856373) i rezistentnog izolata (GenBank access.no. AY856374) su mapirane pomoću on-line aplikacije Webcutter 2.0. Dobijena analiza (u Prilogu) je ukazala da se razlika u sekvenci 198 kodona osetljivih i rezistentnih (**Davidson i sar., 2006**) izolata može detektovati restrikcijom sa enzimom Bsh1236I (CG↓CG) (BSTUI, Fermentas) – Slika 7a. Digestija PCR produkata je izvršena prema uputstvu proizvođača, a nakon toga su produkti razdvojeni putem elektroforeze na 1.7% agaroznom gelu, sa 50% agaroze visoke rezolucije (Carl Roth GmbH).



## **Poljski ogledi**

Poljski ogledi u uslovima veštačkih inokulacija su postavljeni u cilju provere efikasnosti fungicida u suzbijanju odabranih izolata *C. beticola* i sprovedeni su tokom 3 godine istraživanja: 2009, 2010 i 2011. godine.

U prvoj godini ispitivana je efikasnost fungicida na bazi flutriafola (DeMethylation Inhibitors – DMI fungicidi) u suzbijanju izolata *C. beticola* koji su različite osetljivosti prema flutriafolu.

U drugoj i trećoj godini ispitivanja je proverena efikasnost fungicida na bazi azoksistrobina (Quinine outside Inhibitors-Qol fungicidi), karbendazima (Methyl Benzimidazole Carbamates-MBC fungicidi), kao i flutriafola i tetrakonazola (DMI fungicidi), dok su za pripremu inokuluma za veštačke inokulacije korišćeni izolati poznate osetljivosti prema flutriafolu i karbendazimu i tetrakonazolu.

Svi izolati za veštačke inokulacije su odabrani nakon *in vitro* testiranja osetljivosti izolata prema flutriafolu, karbendazimu i tetrakonazolu.

### **Priprema i aplikacija inokuluma**

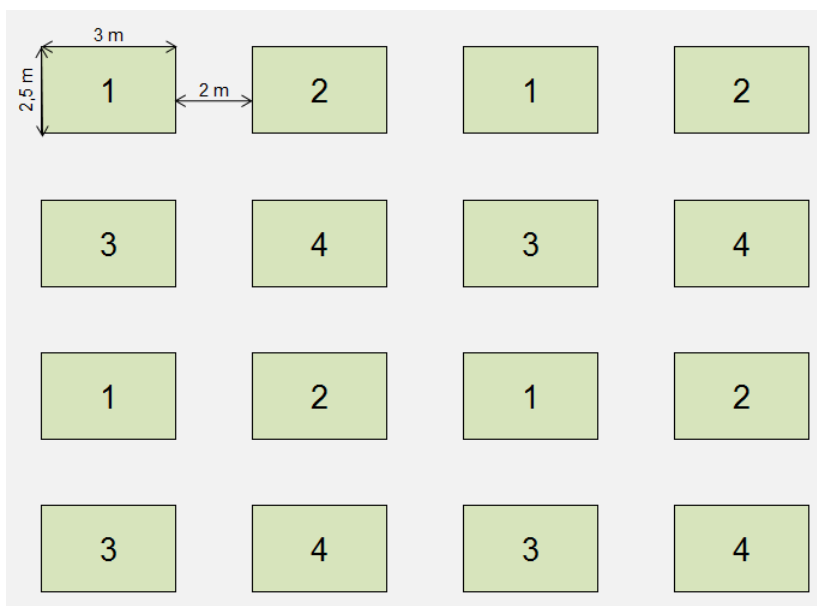
Inokulum je pripremljen u obliku suspenzije konidija koje su proizvedene na podlozi od listova šećerne repe (Sugar Beet Leaf extract Agar -SBLA) po sledećoj recepturi: 150-200 g svežih listova šećerne repe se prokuva u 1L destilovane vode; nakon ostranjivanja listova se dodaje 20 g agara. Koncentracija suspenzije je podešena na 500 spora/ml, što je utvrđeno brojanjem

spora pomoću hemocitometra. Nanošenje inokuluma na biljke izvršeno je kada su vremenski uslovi pogodovali razvoju bolesti prskanjem biljaka suspenzijom koristeći leđnu prskalicu uz utrošak 300 L vode/ha.

## **Dizajn ogleda**

U prvoj godini ispitivanja, ogled je izveden na lokalitetu Turija na sorti šećerne repe Laetitia (KWS, Nemačka), koja je osetljiva prema *C. beticola*.

Eksperiment je dizajniran prema slučajnom blok sistemu sa 4 tretmana u 4 ponavljanja (Slika 8), sa elementarnom parcelom veličine 7,5 m<sup>2</sup> koja je bila prekrivena "Agril" folijom u cilju očuvanja vlage. Inokulacija je izvedena 2. jula 2009. godine, kada su vremenski uslovi pogodovali razvoju bolesti, sa izolatima koji su bili: a) osetljivi prema flutriafolu; b) rezistentni prema flutriafolu.

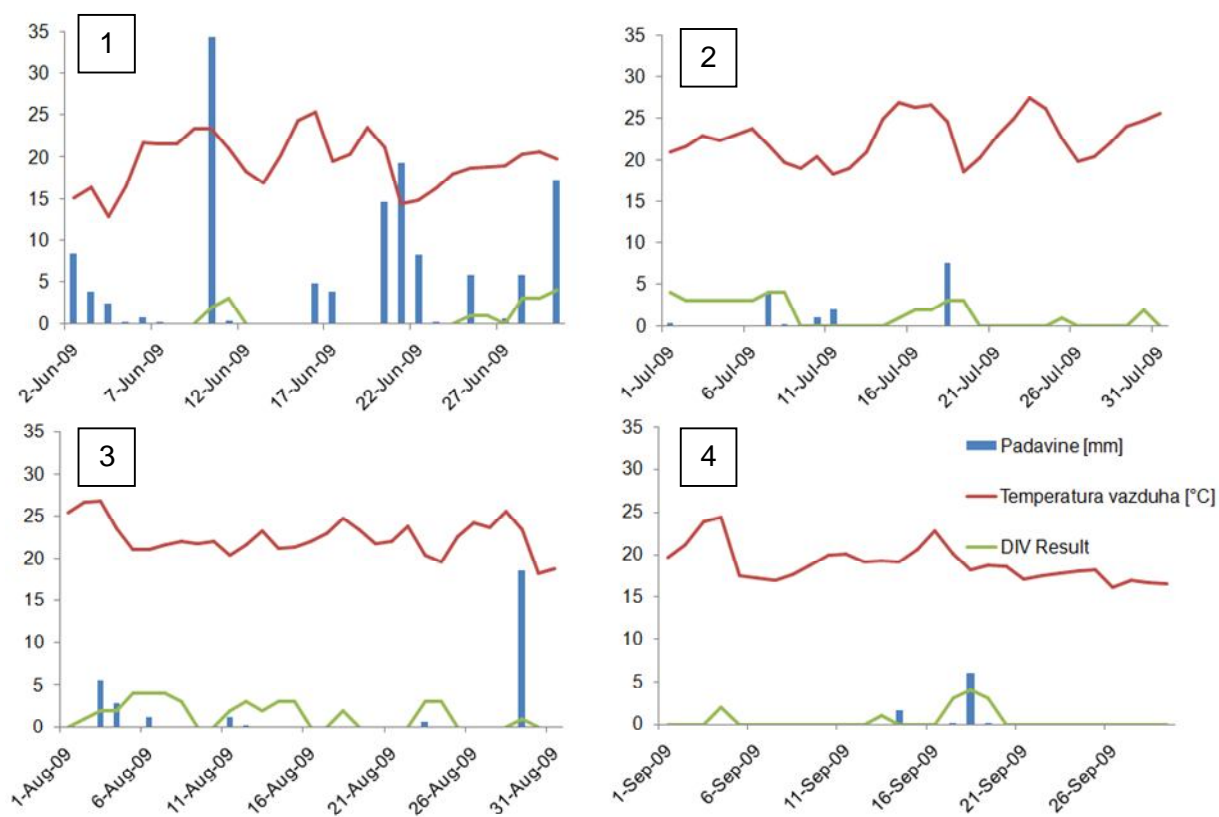


Slika 8. Plan poljskog ogleda ispitivanja biološke efikasnosti flutriafola u suzbijanju izolata *C. beticola* koji su osetljivi i rezistentni prema flutriafolu u Turiji 2009. godine.

Legenda: 1-inokulacija izolatima rezistentnim prema flutriafolu i tretiranje flutriafolom; 2-inokulacija izolatima osetljivim prema flutriafolu i tretiranje flutriafolom; 3- inokulacija izolatima rezistentnim prema flutriafolu bez tretiranja flutriafolom; 4- inokulacija izolatima osetljivim prema flutriafolu bez tretiranja flutriafolom.

Prva aplikacija fungicida na bazi flutriafola (Takt, 125 g/L, Herbos, Hrvatska) je izvršena šest dana nakon inokulacije (8. jula 2009. godine). Ukupno su izvedene 4 aplikacije, svakih 14-20 dana do momenta vađenja šećerne repe sredinom septembra 2009. godine. Meteorološki

podaci i vrednosti dnevnih infektivnih vrednosti (DIV) za *C. beticola* u Turiji su prikazani u Grafikonima 1-4.



Grafikon 1-4: Suma padavina, srednja dnevna temperatura i vrednosti DIV-a tokom: 1-juna, 2-jula, 3-avgusta i 4-septembra 2009. godine u Turiji.



U drugoj i trećoj godini ispitivanja, ogledi su sprovedeni na sorti šećerne repe Lara na oglednim poljima Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad. Poljski ogledi su postavljeni u 8 kolona (8m x 31,5m) – Slika 9. Veličina elementarne parcele je iznosila 24m<sup>2</sup> (6 redova šećerne repe dužine 8m).

1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5	5
1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5	5

Slika 9. Plan ogleda ispitivanja biološke efikasnosti flutriafola, karbendazima, tetrakonazola i azoksistrobina u suzbijanju izolata *C. beticola* različite osetljivosti prema ispitivanim fungicidima na Rimskim Šančevima 2010 i 2011. godine

Legenda: Tretiranja fungicidima na bazi: 1-karbendazima, 2-flutriafola, 3-tetrakonazola, 4-azoksistrobina, 5-netretirana kontrola. Kombinacije izolata:  FSBS - osetljivi prema flutriafolu i karbendazimu,  FSBR - umereno osetljivi prema flutriafolu i osetljivi prema karbendazimu,  FRBR - rezistentni prema flutriafolu i karbendazimu,  FRBS - osetljivi prema flutriafolu i rezistentni prema karbendazimu

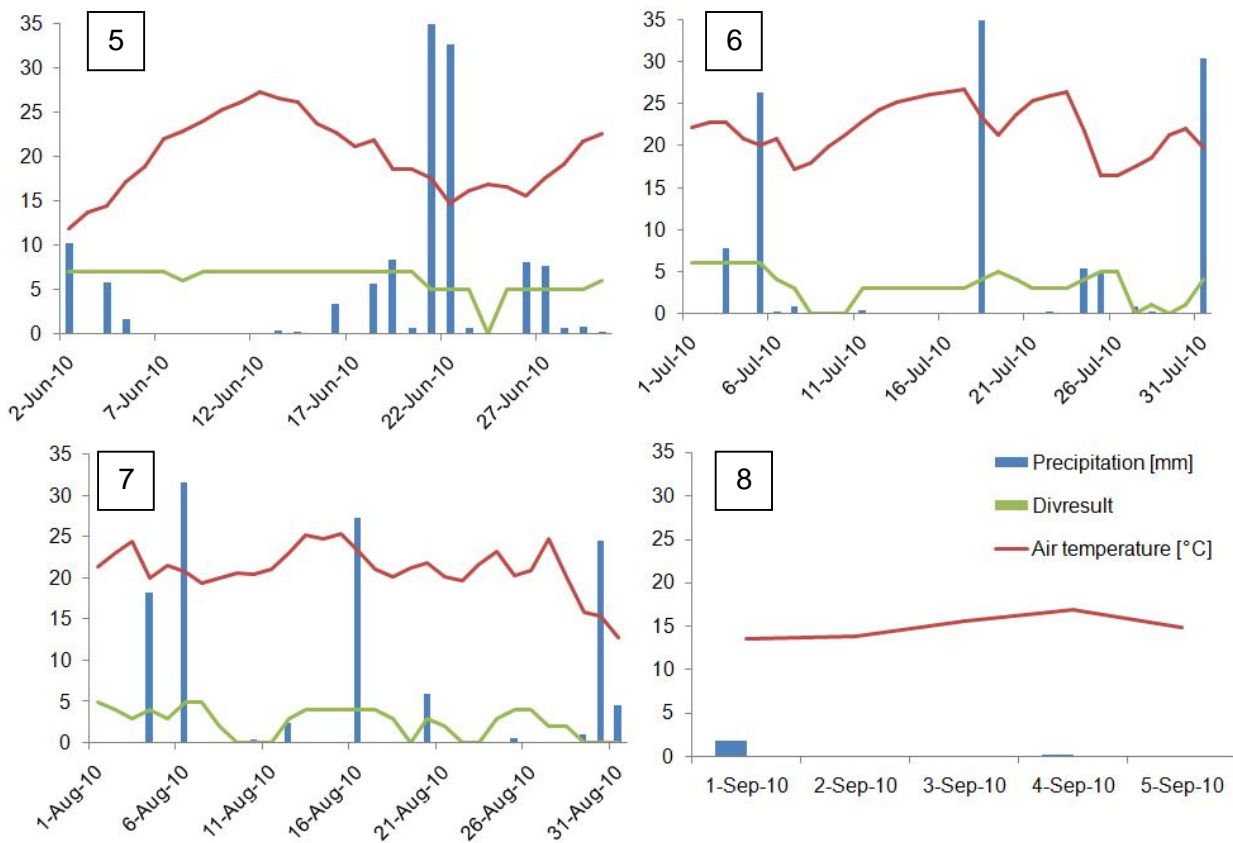
Inokulacija biljaka je izvršena u momentu kada su vremenski uslovi bili stabilni i povoljni za infekciju i razvoj bolesti: 8. jula 2010 i 4. jula 2011. godine. Suspenzija konidija sa dodatkom okvašivača Tween 20 je naneta na biljke pomoću leđne prskalice "Solo". Svaka od inokulisanih parcela, osim netretirane kontrole, je tretirana sa jednim od navedenih fungicida: Galofungin (karbendazim 500 g/L, Galenika, Srbija), Takt (flutriafol 125 g/L, Herbos, Hrvatska), Eminent (tetrakonazol 125 g/L, Isagro) i Quadris (azoxistrobin 125 g/L, Syngenta). Prvi aplikacija fungicida je u obe godine urađena 7 dana nakon inokulacije, dok su ostale sprovedene u sledećim terminima: 30. jul, 20. avgust i 4. septembar 2010. godine, kao i 20. jul, 3. avgust, 16. avgust i 6. septembar 2011. godine.

Intenzitet oboljenja je ocenjen 4 puta u 2010. godini, odnosno 5 puta u 2011. godini, u istim terminima kad su obavljene aplikacije fungicidima, dok je poslednja ocena urađena 7 dana po poslednjoj aplikaciji. Ocena po 100 listova iz svake elementarne parcele je izvršena primenom skale od 0-9, gde je 0 zdrav list, a 9 potpuno nekrotiran list (Slika 10). Na bazi ovih ocena izračunat je indeks oboljenja (**Mc Kinney, 1923**), a na bazi njega su izvedene vrednosti AUDPC (Area Under Disease Progress Curve) (**Wolf i Veerret, 2002**). Žetva korena radi određivanja prinosa i sadržaja šećera (automatska laboratorija za šećernu repu - Venema automation b.v., Holland) u korenu je urađena 15. septembra 2010, odnosno 23. septembra 2011. godine.

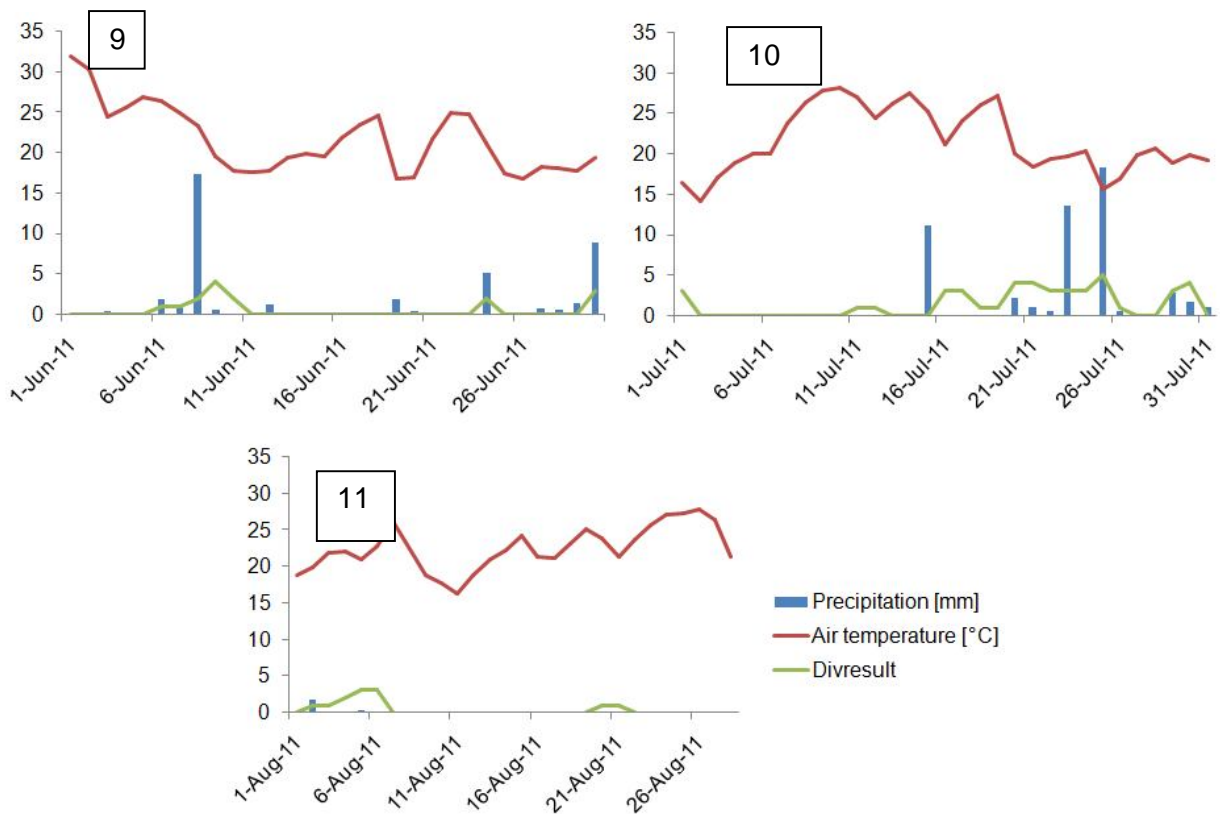


Slika 10. Skala za ocenu intenziteta pegavosti lišća šećerne repe

Meteorološki pokazatelji i vrednosti dnevnih infektivnih vrednosti (DIV) za *C. beticola* na Rimskim Šančevima za period od juna do septembra 2010 i 2011. godine su prikazani u Grafikonima 5-11.



Grafikon 5-8: Suma padavina, srednja dnevna temperatura i vrednosti DIV-a tokom: 5-juna, 6-jula, 7-avgusta i 8-septembra 2010. godine na Rimskim Šančevima.



Grafikon 9-11: Suma padavina, srednja dnevna temperatura i vrednosti DIV-a (Daily infective values) tokom: 9-juna, 10-jula i 11-avgusta 2011. godine na Rimskim Šančevima.

Efikasnost fungicida je izračunata na osnovu poslednje ocene intenziteta oboljenja pre pojave retrovegetacije putem formule:

$$EF (\%) = \frac{100 - (I_o(t) \times 100)}{I_o(k)}$$

gde je EF efikasnost fungicida,  $I_o(t)$  prosečan intenzitet oboljenja u parcelama tretiranim fungicidima i  $I_o(k)$  prosečan intenzitet oboljenja u netretiranoj kontroli.

## **Analiza podataka**

Svi rezultati su prikazani kao prosek  $\pm$  standardna devijacija. Statistička analiza je izvršena putem analize varijanse (ANOVA) primenom softvera Statistica 12 (StatSoft, Tulsa, OK). Poređenja između parova proseka su urađena pomoću Duncan-ovog ili Fisher-ovog testa na nivou značajnosti od 5%. Korelacija porasta micelije na različitim podlogama je izražena Pearsonovim koeficijentom.

## REZULTATI RADA

### ***Formiranje kolekcije izolata***

Nakon inkubacije listova šećerne repe sa tipičnim simptomima pegavosti lista, koju prouzrokuje *Cercospora beticola*, došlo je do sporulacije patogena i formiranja tipičnih konidija u okviru pega na listovima (Slika 11). Dobijeno je ukupno 609 monosporijalnih izolata, od kojih je za dalja ispitivanja odabrano 103. Podaci o lokalitetima i šiframa izolata koji su korišćeni u istraživanju su dati u Tabeli 7.



Slika 11. List šećerne repe sa karakterističnim simptomima i sporulacija patogena

Tabela 7. Lokaliteti sa kojih su prikupljeni listovi šećerne repe i šifre prihvaćenih izolata

Redni broj	Lokalitet	Šifra izolata
1	Kač	CB 1, CB 3, CB 10, CB 300
2	Temerin	CB 72, CB 80, CB 82, CB 84, CB 107, CB 112, CB 236, CB 600
3	Bečej	CB 74, CB 115, CB 118, CB 191, CB 194, CB 196, CB 198
4	Čurug	CB 78, CB 206, CB 207, CB 209
5	Gložan	CB 128, CB 186, CB 188
6	Bački Maglić	CB 133
7	Zmajevo	CB 135
8	Žabalj	CB 7, CB 211
9	Sirig	CB 204, CB 535, CB 596
10	Srbobran	CB 292
11	Turija	CB 310
12	Čenej	CB 591
13	Dunavac	CB 75, CB 609
14	Vrbas	CB 257, CB 306, CB 316
15	Omoljica	CB 23
16	Vršac	CB 20, CB 25, CB 551
17	Kovin	CB 33
18	Banatski Karlovac	CB 39, CB 40
19	Izbište	CB 43, CB 44
20	Kovačica	CB 50
21	Besni Fok	CB 94
22	Opovo	CB 603
23	Despotovo	CB 106
24	Kucura	CB 322
25	Bački Gračac	CB 382
26	Sivac	CB 388
27	Sombor	CB 425
28	Apatin	CB 504, CB 515
29	Kupusina	CB 605
30	Vajska	CB 253, CB 254
31	Čelarevo	CB 299
32	Ratkovo	CB 313
33	Kisač	CB 317
34	Obrovac	CB 319
35	Karavukovo	CB 412



Redni broj	Lokalitet	Šifra izolata
36	Kraljevci	CB 125
37	Beška	CB 152
38	Inđija	CB 157, CB 179, CB 184, CB 185
39	Lačarak	CB 165
40	Golubinci	CB 170
41	Popinci	CB 171
42	Žarkovac	CB 173
43	Subotište	CB 174, CB 175
44	Veliki Radinci	CB 183
45	Surčin	CB 346
46	Sremska Mitrovica	CB 369
47	Prhovo	CB 440
48	Kikinda	CB 508
49	Mokrin	CB 522, CB 523
50	Banatsko Veliko Selo	CB 526
51	Aleksa Šantić	CB 538
52	Bačko Dobro Polje	CB 543
53	Gornji Breg	CB 546
54	Senta	CB 547, CB 577, CB 579
55	Feketić	CB 561, CB 567
56	Pačir	CB 575
57	Zrenjanin	CB 564
58	Blitva, Sremska Kamenica	CB 581, CB 582
59	Cvekla, Futog	CB 586, CB 587, CB 588

## **Morfološke i odgajivačke karakteristike *Cercospora beticola***

Porast izolata *C. beticola* je praćen tokom desetodnevnog perioda na tri ispitivane podloge: KDA-Krompir dekstrozni agar, MA-Malc agar i CZ-Czapekova podloga. Opisana je boja i tekstura micelije (Tabela 8-10) i meren je prečnik kolonija (Tabela 12).

Svi testirani izolati su na ispitivanim podlogama pokazali veliku varijabilnost. Najveća varijabilnost je uočena na KDA i SA podlogama, a najmanja na CZ podlozi.

Tabela 8. Boja i tekstura kolonija na krompir dekstroznom agaru-KDA (broj i % izolata)

<b>Boja</b>	<b>Broj izolata</b>	<b>%</b>	<b>Tekstura</b>	<b>Broj izolata</b>	<b>%</b>
<b>A</b>	9	8.8	<b>a / a*</b>	36 / 4	35.3 / 3.9
<b>B</b>	48	47.1	<b>b</b>	3	2.9
<b>C</b>	23	22.5	<b>c</b>	7	6.9
<b>D</b>	2	2.0	<b>d</b>	7	6.9
<b>E</b>	11	10.8	<b>e</b>	1	1.0
<b>F</b>	0	0.0	<b>f</b>	0	0.0
<b>G</b>	9	8.8	<b>g / g* / g**</b>	34 / 7 / 3	33.3 / 6.9 / 2.9
<b>Ukupno</b>	102	100		102	100

Najveći broj izolata na KDA obrazovao je svetlo sive kolonije sa ili bez tamno sivog oboda (Tabela 8). Tekstura kolonija je u većini slučajeva bila granulozna (35.3%) sa 3.9% izolata koji su u okviru ove kategorije imali radijalno zoniranu koloniju, ili somotasta (33.3%) sa 6.9% izolata koji su bili radijalno zonirani i 2.9% sa talasastim obodom kolonije.

Tabela 9. Boja i tekstura kolonija na sladnom agaru-SA (broj i % izolata)

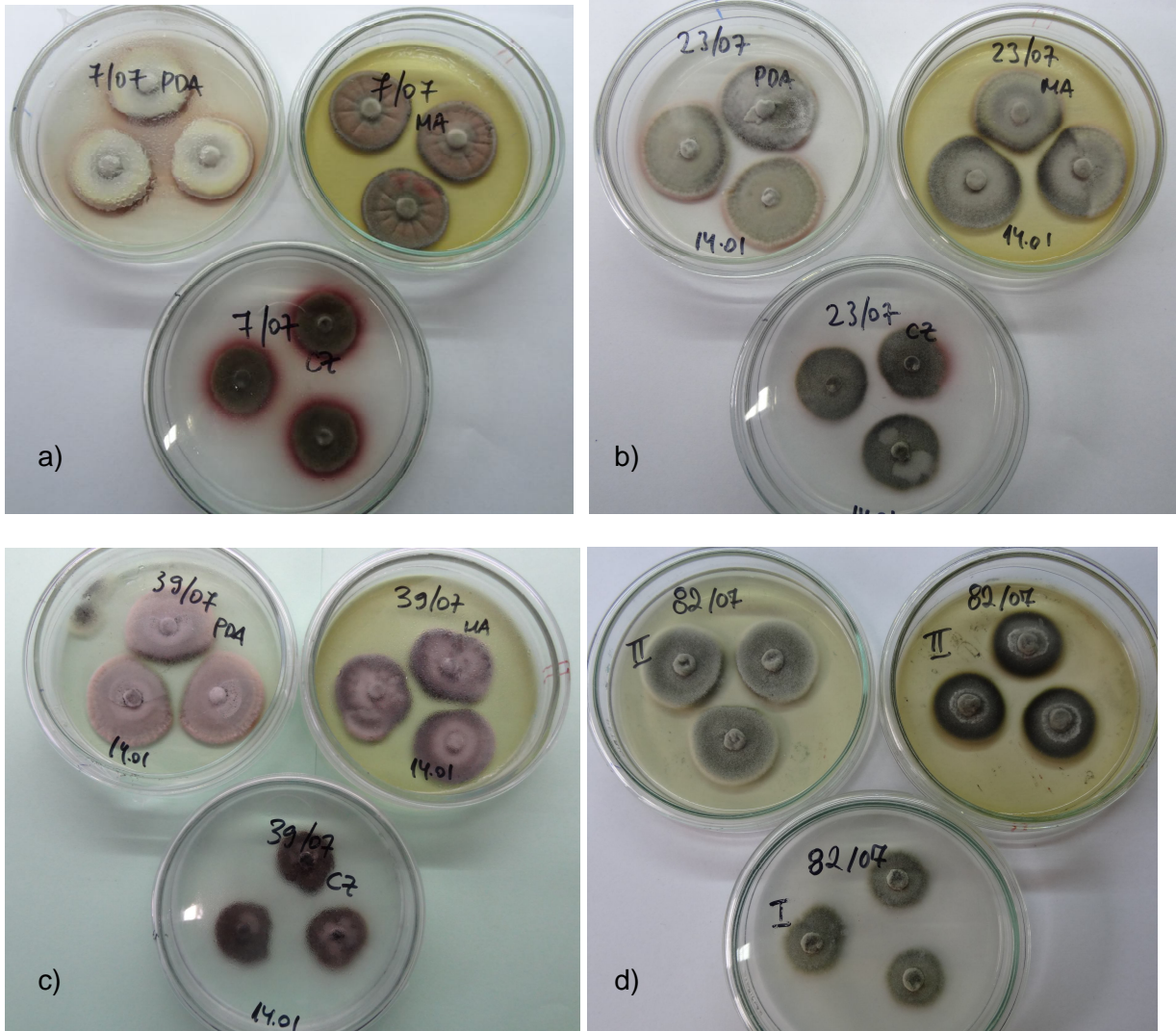
Boja	Broj izolata	%	Tekstura	Broj izolata	%
<b>A</b>	27	26.5	<b>a / a*</b>	39 / 4	38.2 / 3.9
<b>B</b>	42	41.2	<b>b / b*</b>	1 / 1	1.0 / 1.0
<b>C</b>	17	16.7	<b>C</b>	7	6.9
<b>D</b>	0	0.0	<b>D</b>	3	2.9
<b>E</b>	9	8.8	<b>E</b>	2	2.0
<b>F</b>	3	2.9	<b>F</b>	0	0.0
<b>G</b>	4	3.9	<b>g / g* / g**</b>	39 / 5 / 1	38.2 / 4.9 / 1.0
<b>Ukupno</b>	102	100		102	100

Na sladnom agaru (SA) izolati su formirali u najvećem procentu svetlo sivu miceliju (41,2%) dok je većina ostalih izolata obrazovala tamno sivo crne kolonije (26.5%) i svetlo sivu miceliju sa tamno sivim obodom (16.7%) – Tabela 9. Tekstura micelije kod najvećeg broja izolata granulozna (38.2%) sa 3.9% izolata sa radijalno zoniranom micelijom, ili somotasta (38.2%) sa 4.9% izolata koji su bili radijalno zonirani i 1.0% sa talasastim obodom kolonije.

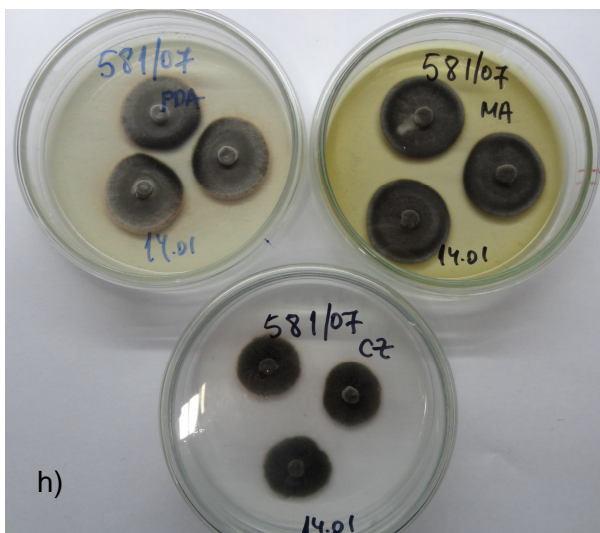
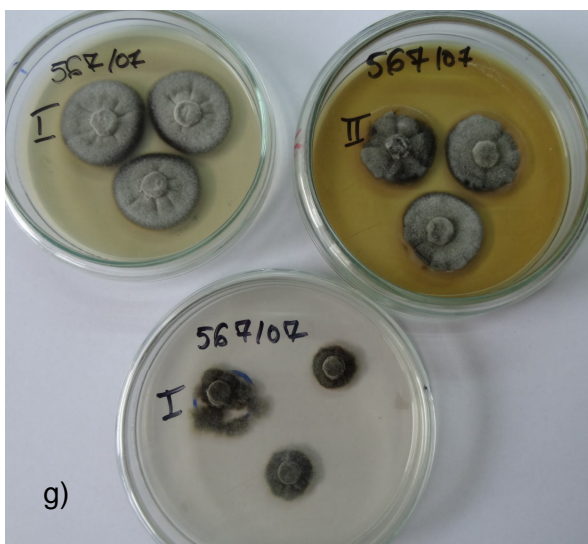
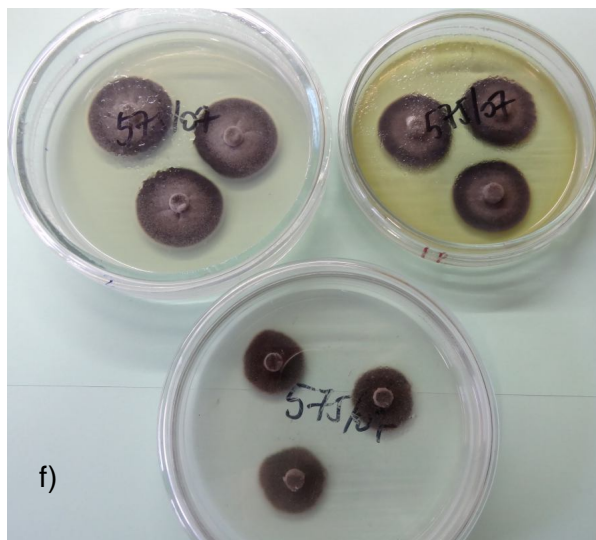
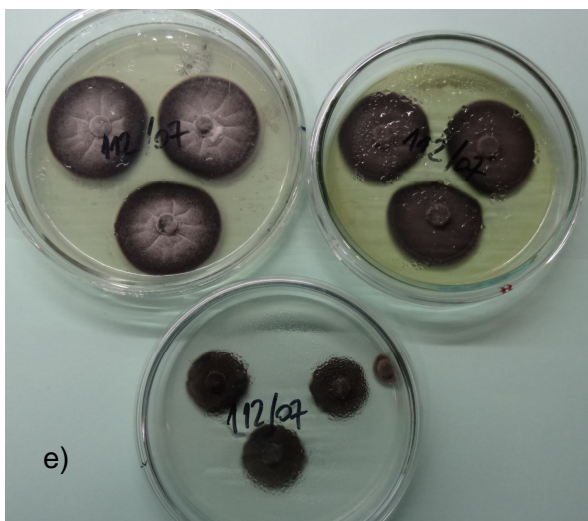
Tabela 10. Boja i tekstura kolonija na Čapekovom agaru-CZ (broj i % izolata)

Boja	Broj izolata	%	Tekstura	Broj izolata	%
<b>A</b>	5	4.9	<b>a / a* / a**</b>	69 / 1 / 3	67.7 / 1.0 / 2.9
<b>B</b>	9	8.8	<b>b</b>	0	0.0
<b>C</b>	0	0.0	<b>c</b>	8	7.8
<b>D</b>	0	0.0	<b>d</b>	0	0.0
<b>E</b>	18	17.7	<b>e</b>	0	0.0
<b>F</b>	0	0.0	<b>f</b>	0	0.0
<b>G</b>	70	68.6	<b>g</b>	21	20.6
<b>Ukupno</b>	102	100		102	100

Na Czapek-ovoj podlozi (CZ) izolati su obrazovali tamno (68.6%) ili svetlo (17.7%) maslinasto zelenu miceliju sa granuloznom (67.7%) ili somotastom teksturom (20.6)-Tabela 10.



Slika 12. Porast izolata *Cercospora beticola* na Krompir dekstroznom agaru, Sladnom agaru (gornji red) i Čapekovej podlozi (donji red): a) CB 7, b) CB 23, c) CB 39, d) CB 82



Slika 12-nastavak. Porast izolata *Cercospora beticola* na Krompir dekstroznom agaru, Sladnom agaru (gornji red) i Čapekovoju podlozi (donji red): a) CB 112, b) CB 575, c) CB 567, d) CB 581

Kada je u pitanju porast izolata, najbrži porast kod svih izolata u proseku je registrovan na KDA podlozi, a najmanji na CZ. Analizom varijanse je utvrđeno da postoje značajne razlike između izolata (Tabela 11) jer su su P vrednosti F testa za sve tri ispitivane podloge bile ispod 0,05. Značajnost razlika između porasta testiranih izolata je prikazana u Tabeli 12.

Tabela 11. Analiza varijanse proseka prečnika micelije na tri ispitivane podloge.

Izvor varijacije	Suma kvadrata	SS	Sredina kvadrata	F-odnos	P-vrednost
Izolati na KDA	67.3397	101	0.66673	39.75	0*
Izolati na SA	66.9747	101	0.663115	61.14	0*
Izolati na CZ	92.6968	101	0.91779	69.34	0*

Najmanji porast micelije na KDA podlozi imao je izolat CB 133 (1.4 cm) koji je imao značajno niži prečnik u odnosu na sve ostale izolate (Tabela 12). Značajno najveći porast imali su izolati CB 551 (3.80 cm) i CB 561 (3.76 cm).

Na SA podlozi najmanji porast je registrovan kod izolata CB 600 (2.00 cm), a u istom rangu značajnosti bili su i izolati CB 3 (2.06 cm), CB 412 (2.06 cm), CB 173 (2.1 cm), CB 257 (2.1 cm) i CB 118 (2.1 cm)-Tabela 12. Najveći porast na SA imali su izolati CB 561 (3.65 cm), CB 319 (3.65 cm), CB 547 (3.70 cm) i CB 211 (3.70 cm).

Na CZ podlozi, značajno najniži porast je registrovan kod izolata CB 322 (0.48 cm) i CB 382 (0.38 cm), dok je najviši porast registrovan kod CB 211 (3.06 cm) -Tabela 12.

Testirana je i korelacija porasta izolata između po dve ispitivane podloge i utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija ( $P < 0.05$ ). Pearsonovi koeficijenti za vrednosti prečnika



micelije između parova podloga su iznosile: KDA i MA 0.5106, KDA i CZ 0.337, SA i CZ 0.3048.

Tabela 12. Uticaj vrste hranljive podloge i izolata na porast micelije *C. beticola* (cm)

Izolat	KDA		SA		CZ	
	Prečnik	Rang	Prečnik	Rang	Prečnik	Rang
CB 1	2.85	xxx	2.85	xxx	1.43	xxxxxx
CB 10	2.30	xxxx	2.30	xxxxxxx	1.70	xxxxxx
CB 106	2.47	xxxxxxx	2.42	xxxx	1.23	xxxx
CB 107	2.53	xxxxxx	2.53	xxxx	1.42	xxxxx
CB 112	2.75	xx	2.28	xxxxxxx	1.42	xxxxx
CB 115	2.48	xxxxxxx	2.28	xxxxxxx	1.98	xxx
CB 118	2.32	xxxxx	2.10	xxx	1.63	xxxxxxx
CB 125	2.45	xxxxxxx	2.55	xxx	1.52	xxxxxxx
CB 128	2.52	xxxxxx	2.28	xxxxxxx	1.63	xxxxxxx
CB 133	1.40	x	2.28	xxxxxxx	1.20	xxxx
CB 135	2.12	xxx	2.28	xxxxxxx	1.50	xxxxxxx
CB 152	2.12	xxx	2.37	xxxx	1.45	xxxxxx
CB 157	2.78	xxx	2.90	xx	1.87	xxx
CB 165	2.10	xx	2.43	xxxx	1.50	xxxxxxx
CB 170	2.28	xxx	2.50	xxxx	1.57	xxxxxxx
CB 171	2.30	xxxx	2.53	xxxx	1.58	xxxxxxx
CB 173	2.38	xxxxxxx	2.10	xxx	1.42	xxxxx
CB 174	2.28	xxx	2.40	xxxx	1.50	xxxxxxx
CB 175	2.30	xxxx	2.37	xxxx	1.52	xxxxxxx
CB 179	2.32	xxxxx	2.35	xxxxx	1.50	xxxxxxx
CB 183	2.32	xxxxx	2.30	xxxxxxx	1.48	xxxxxxx
CB 184	2.57	xxxx	2.28	xxxxxxx	1.70	xxxxxx
CB 185	2.30	xxxx	2.35	xxxxx	1.50	xxxxxxx
CB 186	2.32	xxxxx	2.35	xxxxx	1.50	xxxxxxx
CB 188	2.32	xxxxx	2.35	xxxxx	1.50	xxxxxxx
CB 191	2.30	xxxx	2.35	xxxxx	1.50	xxxxxxx
CB 194	2.30	xxxx	2.35	xxxxx	1.50	xxxxxxx
CB 196	2.48	xxxxxxx	2.30	xxxxxxx	1.67	xxxxxx
CB 198	2.35	xxxxxx	2.32	xxxxxxx	1.53	xxxxxxx

CB 20	2.40	xxxxxxx	2.40	xxxx	1.48	xxxxxxx
CB 204	2.35	xxxxxx	2.32	xxxxxxx	1.55	xxxxxxx
CB 206	2.38	xxxxxxx	2.32	xxxxxxx	1.53	xxxxxxx
CB 207	2.38	xxxxxxx	2.33	xxxxxx	1.57	xxxxxxx
CB 209	2.40	xxxxxxx	2.28	xxxxxxx	1.43	xxxxxx
CB 211	3.60	x	3.70	x	3.07	x
CB 23	3.32	x	3.15	x	2.52	x
CB 236	2.35	xxxxxx	2.30	xxxxxxx	1.52	xxxxxxx
CB 25	2.47	xxxxxxx	2.43	xxxx	1.98	xxx
CB 253	2.35	xxxxxx	2.28	xxxxxxx	1.52	xxxxxxx
CB 254	2.37	xxxxxxx	2.30	xxxxxxx	1.50	xxxxxxx
CB 257	2.10	xx	2.10	xxx	1.32	xxxxx
CB 292	2.40	xxxxxxx	2.33	xxxxxx	1.72	xxxxxx
CB 299	2.72	xxx	2.72	xx	2.03	xx
CB 3	2.08	x	2.07	xx	1.40	xxxxx
CB 300	2.30	xxxx	2.25	xxxxxxx	1.47	xxxxxx
CB 306	2.30	xxxx	2.22	xxxxxx	1.48	xxxxxxx
CB 310	2.25	xxx	2.22	xxxxxx	1.50	xxxxxxx
CB 313	2.30	xxxx	2.23	xxxxxx	1.55	xxxxxxx
CB 316	2.30	xxxx	2.23	xxxxxx	1.50	xxxxxxx
CB 317	2.30	xxxx	2.23	xxxxxx	1.50	xxxxxxx
CB 319	3.40	xx	3.65	x	2.60	xx
CB 322	2.67	xxx	2.58	xxx	0.48	x
CB 33	2.65	xxxx	2.55	xxx	1.62	xxxxxxx
CB 346	2.40	xxxxxxx	2.32	xxxxxxx	1.27	xxxxx
CB 369	2.40	xxxxxxx	2.33	xxxxxx	1.20	xxxx
CB 382	2.45	xxxxxxx	2.57	xx	0.38	x
CB 388	2.47	xxxxxxx	2.42	xxxx	0.80	x
CB 39	2.98	x	2.75	xxx	1.93	xxx
CB 40	2.38	xxxxxxx	2.28	xxxxxxx	1.08	xx
CB 412	2.45	xxxxxxx	2.07	xx	1.63	xxxxxxx
CB 425	2.43	xxxxxxx	2.35	xxxxx	1.00	x
CB 43	2.48	xxxxxxx	2.42	xxxx	1.52	xxxxxxx
CB 44	2.48	xxxxxxx	2.40	xxxx	1.42	xxxxx
CB 440	2.53	xxxxxx	2.52	xxxx	1.17	xxx
CB 50	2.65	xxxx	2.93	x	2.02	xx
CB 504	2.47	xxxxxxx	2.33	xxxxxx	1.15	xx
CB 508	2.47	xxxxxxx	2.30	xxxxxxx	1.23	xxxx

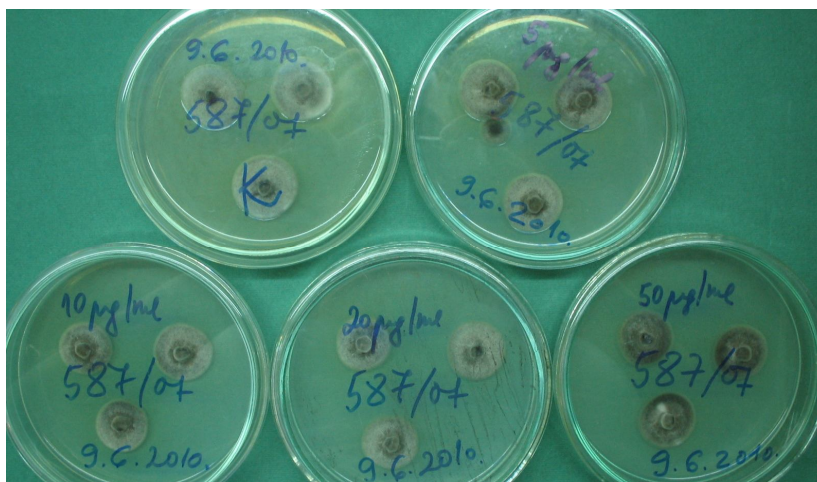


CB 515	2.38	xxxxxxx	2.65	xxx	1.70	xxxxxx
CB 522	2.40	xxxxxxx	2.13	xxx	1.73	xxxxx
CB 523	2.42	xxxxxxxxx	2.35	xxxxx	1.43	xxxxxx
CB 526	2.42	xxxxxxxxx	2.35	xxxxx	1.52	xxxxxxxxx
CB 535	2.40	xxxxxxx	2.33	xxxxxx	1.60	xxxxxxxxx
CB 538	2.37	xxxxxxx	2.20	xxxxx	0.98	x
CB 543	2.38	xxxxxxx	2.32	xxxxxxxxx	1.37	xxxxx
CB 546	2.38	xxxxxxx	2.32	xxxxxxxxx	1.37	xxxxx
CB 547	3.48	xx	3.70	x	2.70	x
CB 551	3.80	x	3.27	x	2.27	x
CB 561	3.77	x	3.65	x	2.87	x
CB 564	2.37	xxxxxxxxx	2.32	xxxxxxxxx	1.33	xxxxx
CB 567	2.85	xxx	2.70	xxx	1.28	xxxxx
CB 575	2.45	xxxxxxxxx	2.35	xxxxx	1.67	xxxxxx
CB 577	2.40	xxxxxxxxx	2.32	xxxxxxxxx	1.42	xxxxx
CB 579	2.42	xxxxxxxxx	2.30	xxxxxxxxx	1.42	xxxxx
CB 581	2.53	xxxxxx	2.80	xxx	1.83	xxx
CB 582	2.43	xxxxxxxxx	2.22	xxxxxx	1.77	xxxx
CB 586	2.42	xxxxxxxxx	2.17	xxxx	1.83	xxx
CB 587	2.40	xxxxxxx	2.30	xxxxxxxxx	1.45	xxxxxx
CB 588	2.45	xxxxxxx	2.20	xxxxxx	1.70	xxxxxx
CB 591	2.43	xxxxxxxxx	2.30	xxxxxxxxx	1.50	xxxxxxxxx
CB 596	2.42	xxxxxxxxx	2.30	xxxxxxxxx	1.45	xxxxxx
CB 600	2.43	xxxxxxxxx	2.00	x	2.00	xx
CB 603	2.42	xxxxxxxxx	2.22	xxxxxx	1.58	xxxxxxxxx
CB 605	2.42	xxxxxxxxx	2.18	xxxxx	1.65	xxxxxxxxx
CB 609	2.50	xxxxxx	2.33	xxxxxx	2.07	x
CB 7	2.77	xx	2.93	x	1.87	xxx
CB 72	2.52	xxxxxx	2.58	xxx	1.65	xxxxxxxxx
CB 74	2.92	xx	2.85	xxx	1.75	xxxxx
CB 75	2.23	xxx	2.23	xxxxxx	1.15	xx
CB 78	2.55	xxxxx	2.53	xxxx	1.52	xxxxxxxxx
CB 80	2.55	xxxxx	2.53	xxxx	1.47	xxxxxx
CB 82	2.67	xxx	2.42	xxxx	1.82	xxxx
CB 84	2.60	xxxx	2.70	xxx	1.47	xxxxxx
CB 94	2.57	xxxx	2.55	xxx	1.58	xxxxxxxxx
PROSEK	2.49		2.45		1.57	

## ***In vitro* testiranja osetljivosti prema fungicidima**

### **Utvrđivanje diskriminativne koncentracije prema karbendazimu**

Kvantitativna osetljivost prema karbendazimu je kod pet referentnih izolata testirana na ukupno 10 koncentracija: 1, 2, 4, 5, 8, 10, 16, 20, 32 i 50  $\mu\text{g/mL}$  (Slika 13). Iako prema našim podacima, ovi izolati nisu ranije bili tretirani fungicidima,  $\text{EC}_{50}$  za karbendazim je kod svih izolata iznosio preko 50  $\mu\text{g/mL}$ . Stoga je za diskriminativnu koncentraciju korišćeno 5  $\mu\text{g/mL}$  prema **Weiland i Halloin (2001)** i **Karaoglanidis i Ioannidis (2010)**, što je opravdano zbog kvalitativne prirode otpornosti prema benzimidazolima.



Slika 13. Porast izolata CB 587 na podlozi bez i sa 5  $\mu\text{g/mL}$  karbendazima (gornji red) i sa 10, 20 i 50  $\mu\text{g/mL}$  karbendazima.

## Utvrđivanje diskriminativne koncentracije prema flutriafolu

Osetljivost referentne populacije prema flutriafolu je prikazana u Tabeli 13. Prosečna vrednost  $EC_{50}$  iznosila je 0,8  $\mu\text{g/mL}$ , te je za diskriminativnu koncentraciju za kvalitativno testiranje osetljivost ostalih *C. beticola* izolata prema flutriafolu uzeta prva sledeća viša testirana koncentracija- 1.25  $\mu\text{g/mL}$ . Faktor rezistentnosti kod najmanje osetljivog izolata je iznosio 3.37.

Tabela 13. Parametri osetljivosti referentne populacije na flutriafol

Izolat	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	b	RF*
CB 581	0.87		2.90
CB 582	0.91		3.03
CB 586	0.90		3.00
CB 587	0.30		1.00
CB 588	1.01		3.37
PROSEK	0.80		-

\*Faktor rezistentnosti

## Utvrđivanje diskriminativne koncentracije prema tetrakonazolu

Testiranje osetljivosti referentnih izolata na tetrakonazol je pokazala da je prosečna  $EC_{50}$  iznosila 0.48  $\mu\text{g/mL}$ , te je za diskriminativnu koncentraciju uzeto 0.6  $\mu\text{g/mL}$ . Najmanje osetljiv izolat bio je CB 586, čiji je faktor rezistentnosti iznosio 2.60.

Tabela 14. Parametri osetljivosti referentne populacije na tetrakonazol

Izolat	EC <sub>50</sub> (µg/mL)	RF*
CB 581	0.63	2.52
CB 582	0.59	2.36
CB 586	0.65	2.60
CB 587	0.25	1.00
CB 588	0.30	1.20
PROSEK	0.48	-

\*Faktor rezistentnosti

### Utvrđivanje diskriminativne koncentracije prema azoksistrobinu

S obzirom da *C. beticola* u prisustvu fungicida iz grupe strobilurina u hranljivoj podlozi ima sposobnost korišćenja alternativne oksidaze (AOX), što omogućava i osetljivim izolatima da rastu na podlozi sa fungicidom, porast micelije je testiran na podlozi sa dodatkom 1mM salicilhidroksamične kiseline (SHAM). Kod referentne populacije su uočene razlike u osetljivosti prema azoksistrobinu (Tabela 15), a za diskriminativnu koncentraciju je uzeto 0.1 µg/mL.

Tabela 15. Parametri osetljivosti referentne populacije na azoksistrobin

Izolat	EC <sub>50</sub> (µg/mL)	RF*
CB 581	<0.01	1
CB 582	<0.01	1
CB 586	0.01	1
CB 587	0.02	2
CB 588	<0.01	1
PROSEK	0.012	-

\*Faktor rezistentnosti. Za računanje RF kod izolata CB 581, CB 582 i CB 588 je za EC<sub>50</sub> uzeta vrednost od 0.01 µg/mL.

## Testiranje kvalitativne osetljivosti izolata prema karbendazimu

S obzirom da su svi referentni izolati rasli na koncentracijama koje su primenjivane za utvrđivanje diskriminativne koncentracije, u cilju utvrđivanja kvalitativne osetljivosti izolata prema karbendazimu primenjena je koncentracija od 5 µg karbendazima /mL koju su opisali Weiland i Halloin (2001). Primena navedene koncentracije je opravdana zbog kvalitativne prirode rezistentnosti prema fungicidima iz grupe benzimidazola. Rezultati su prikazani u Tabeli 8.

Tabela 8. Relativni porast micelije (%) testiranih izolata na podlozi sa diskriminativnim koncentracijama karbendazima, flutriafola, tetrakonazola i azoksistrobina.

R. br.	Lokalitet	Izolat	Karbendazim	Flutriafol	Tetrakonazol	Azoksistrobin
1	Kač	CB 1	113.56	2.26	0.00	0.00
2	Kač	CB 10	103.26	69.22	33.33	-
3	Despotovo	CB 106	102.91	26.67	22.00	0.00
4	Temerin	CB 107	97.98	21.85	2.22	-
5	Temerin	CB 112	149.21	16.51	0.00	0.00
6	Bečej	CB 115	97.65	10.98	0.00	0.00
7	Bečej	CB 118	105.16	34.13	0.00	-
8	Kraljevci	CB 125	0.00	9.87	0.00	0.00
9	Gložan	CB 128	99.61	20.97	2.78	-
10	Bački Maglič	CB 133	98.92	23.30	0.00	-
11	Zmajevo	CB 135	99.30	13.79	0.00	0.00
12	Beška	CB 152	112.38	50.00	21.62	-
13	Inđija	CB 157	94.02	8.33	0.00	0.00
14	Lačarak	CB 165	91.27	11.67	0.00	-
15	Golubinci	CB 170	100.22	31.73	13.64	-
16	Popinci	CB 171	99.81	0.00	0.00	-
17	Žarkovac	CB 173	93.43	0.00	0.00	-
18	Subotište	CB 174	108.05	23.08	6.98	-
19	Subotište	CB 175	99.42	19.80	17.02	-
20	Inđija	CB 179	99.31	92.86	35.71	-
21	Veliki Radinci	CB 183	94.24	19.10	13.89	-

R. br.	Lokalitet	Izolat	Karbendazim	Flutriafol	Tetrakonazol	Azoksistrobin
22	Indija	CB 184	96.42	20.51	3.70	0.00
23	Indija	CB 185	91.74	20.81	3.33	-
24	Gložan	CB 186	100.85	23.35	4.00	-
25	Gložan	CB 188	102.74	18.75	4.35	-
26	Bečej	CB 191	100.78	17.54	0.00	-
27	Bečej	CB 194	96.13	22.01	2.44	-
28	Bečej	CB 196	108.42	21.55	18.18	-
29	Bečej	CB 198	100.81	20.37	6.38	-
30	Bogić	CB 20	77.42	15.48	0.00	-
31	Sirig	CB 204	104.65	0.00	0.00	-
32	Čurug	CB 206	100.02	16.27	0.00	-
33	Čurug	CB 207	100.33	11.30	0.00	0.00
34	Čurug	CB 209	96.03	19.91	0.00	-
35	Žabalj	CB 211	102.05	26.20	0.00	-
36	Omoljica	CB 23	99.76	24.00	4.40	0.00
37	Temerin	CB 236	123.88	44.90	29.41	-
38	Vršac	CB 25	104.39	20.00	7.32	-
39	Vajska	CB 253	102.72	101.81	57.14	-
40	Vajska	CB 254	102.98	112.30	41.67	-
41	Vrbas	CB 257	100.00	53.54	0.00	0.00
42	Srbobran	CB 292	102.81	14.33	0.00	-
43	Čelarevo	CB 299	144.64	30.36	0.00	-
44	Kač	CB 3	96.14	63.25	50.00	-
45	Kač	CB 300	113.26	14.97	0.00	-
46	Vrbas	CB 306	97.27	22.95	11.30	-
47	Turija	CB 310	91.46	21.68	8.33	-
48	Ratkovo	CB 313	103.17	25.40	2.66	-
49	Vrbas	CB 316	2.86	17.14	2.13	-
50	Kisač	CB 317	97.82	20.10	0.00	0.00
51	Obrovac	CB 319	127.27	19.05	0.00	0.00
52	Kucura	CB 322	94.08	46.75	0.00	0.00
53	Kovin	CB 33	99.01	9.50	0.00	-
54	Surčin	CB 346	99.52	0.00	0.00	-
55	Sremska Mitrovica	CB 369	95.27	0.00	0.00	-
56	Bački Gračac	CB 382	93.02	24.42	0.00	0.00
57	Sivac	CB 388	98.99	0.00	0.00	-
58	Banatski Karlovac	CB 39	97.82	21.10	0.00	0.00
59	Banatski Karlovac	CB 40	128.51	22.00	0.00	-
60	Karavukov o	CB 412	99.43	89.66	75.00	0.00
61	Sombor	CB 425	97.05	0.00	0.00	-
62	Izbište	CB 43	94.08	24.06	6.06	-
63	Izbište	CB 44	104.66	16.67	0.00	-
64	Prhovo	CB 440	98.78	0.00	0.00	0.00

R. br.	Lokalitet	Izolat	Karbendazim	Flutriafol	Tetrakonazol	Azoksistrobin
65	Kovačica	CB 50	102.83	32.00	10.00	-
66	Apatin	CB 504	98.92	75.27	55.10	-
67	Kikinda	CB 508	124.80	30.93	7.32	-
68	Apatin	CB 515	10.86	47.90	0.00	0.00
69	Mokrin	CB 522	102.42	32.03	21.70	0.00
70	Mokrin	CB 523	91.62	87.86	25.58	-
71	Banatsko Veliko Selo	CB 526	95.96	19.87	0.00	-
72	Sirig	CB 535	137.32	23.93	0.00	-
73	Aleksa Šantić	CB 538	97.59	95.74	70.60	0.00
74	Bačko Dobro Polje	CB 543	105.07	99.03	85.11	-
75	Gornji Breg	CB 546	104.83	106.62	78.00	-
76	Senta	CB 547	115.08	28.57	0.00	-
77	Vršac	CB 551	106.81	96.77	68.01	0.00
78	Feketić	CB 561	104.56	24.11	0.00	0.00
79	Zrenjanin	CB 564	98.78	24.57	0.00	-
80	Feketić	CB 567	102.07	13.89	0.00	-
81	Pačir	CB 575	106.22	24.00	15.90	0.00
82	Senta	CB 577	92.63	16.84	0.00	-
83	Senta	CB 579	131.69	36.35	0.00	0.00
84	Čenej	CB 591	106.03	90.16	82.20	-
85	Sirig	CB 596	128.67	12.59	0.00	-
86	Temerin	CB 600	98.60	82.48	66.00	-
87	Opovo	CB 603	2.80	68.53	78.57	-
88	Kupusina	CB 605	86.00	86.00	84.78	-
89	Dunavac	CB 609	101.53	18.39	0.00	-
90	Žabalj	CB 7	98.23	27.42	0.00	0.00
91	Temerin	CB 72	98.58	101.82	79.07	-
92	Bečej	CB 74	97.99	19.74	74.42	0.00
93	Dunavac	CB 75	102.78	17.06	8.57	0.00
94	Čurug	CB 78	97.28	20.54	0.00	-
95	Temerin	CB 80	121.90	113.33	82.22	-
96	Temerin	CB 82	105.24	69.35	51.30	0.00
97	Temerin	CB 84	101.00	106.74	65.31	-
98	Besni Fok	CB 94	137.14	48.57	5.60	0.00

Prilikom testiranja osetljivosti izolata *C. beticola* prema karbendazimu, uočeno je jasno razdvajanje osetljivih (RP < 20%) i visoko rezistentnih (RP ≥ 70%) – Grafikon 12. Na podlozi sa 5 µg/ml karbendazima, svega četiri izolata (CB125, CB316, CB515 i CB603) su pokazala

osetljivost prema ovom fungicidu i njihov relativni porast micelije je varirao od 0 do 10,99%. Svi ostali izolati su jednako dobro rasli na podlozi sa i bez karbendazima (RP=77.4-149.2%).

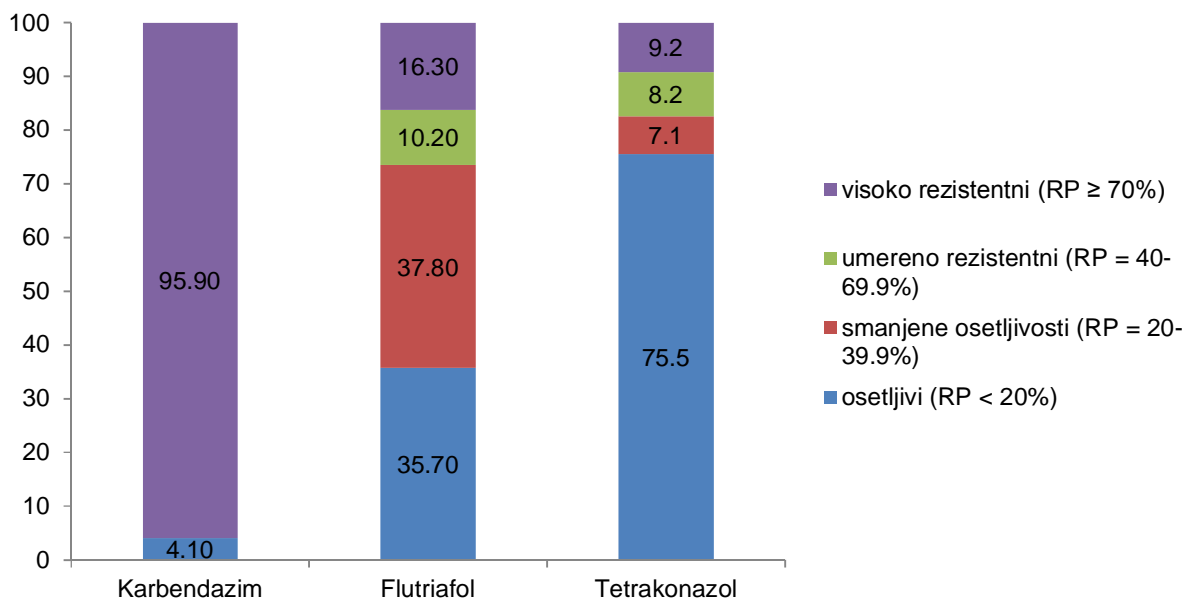
### **Testiranje kvalitativne osetljivosti izolata prema flutriafolu**

Relativni porast micelije (RP) na podlozi sa 1.25 µg flutriafola/ml je varirao od 0% do 113.3%. Na osnovu prosečnog RP, izolati su podeljeni u četiri grupe (Grafikon 12). Najveći broj izolata je imao RP ispod 40%, te su svrstani u grupe osetljivih (35,7%) i izolati smanjene osetljivosti (37,8%). Ostatak su činile preostale dve grupe: umereno rezistentni (10,2% izolata) i visoko rezistentni (16,3%).

### **Testiranje kvalitativne osetljivosti izolata prema tetrakonazolu**

Relativni porast micelije na podlozi sa 0.6 µg tetrakonazola/ml pokazao je da su izolati *C. beticola* osetljiviji prema ovom fungicidu u odnosu na drugi testiran triazol - flutriafol. Relativni porast micelije se kretao u rasponu od 0-85,11% (Tabela 7), s tim da je frekvencija osetljivih izolata (RP<20%) iznosila 75,5% izolata. Ostale grupe izolata su bile: umanjeno osetljivi 7,1%, umereno rezistentni 8,2% i visoko rezistentni 9,2% (Grafikon 12).





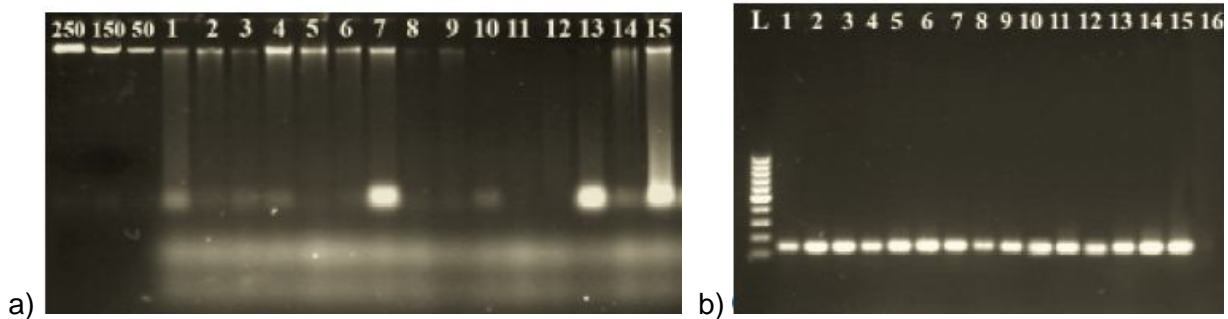
Grafikon 12. Zastupljenost izolata različitog nivoa osetljivosti prema karbendazimu, flutriafolu i tetrakonazolu

### Testiranje kvalitativne osetljivosti izolata prema azoksistrobinu

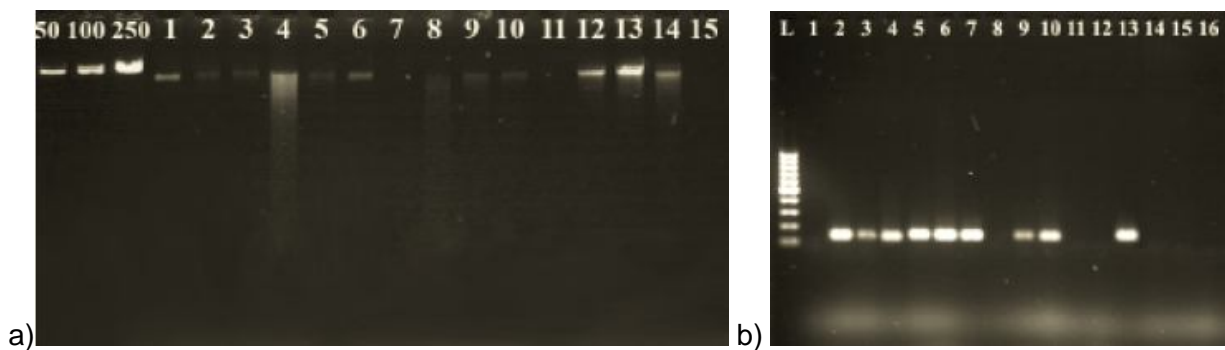
Za testiranje kvalitativne osetljivosti prema azoksistrobinu je odabrano 30 izolata koji su testirani na koncentraciji od 0.1 µg/ml sa dodatkom 1 mM salicilhidroksamične kiseline u cilju inhibicije puta alternativne oksidaze. Ni kod jednog od testiranih izolata nije registrovan porast na podlozi sa dodatkom fungicida.

## ***Molekularne analize***

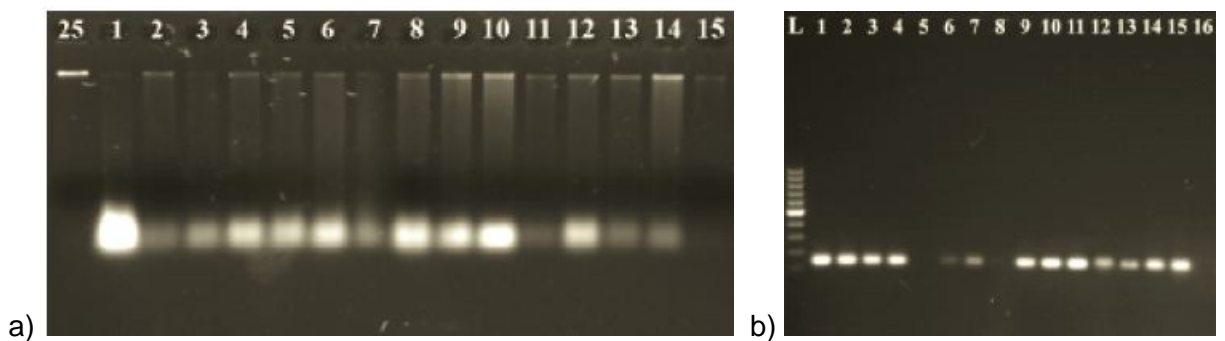
Tokom testiranja efikasnosti protokola za ekstrakciju DNK *Cercospora beticola*, rezultati su pokazali da se prinos i čistoća izolovane DNK razlikovala među protokolima. Vizuelna evaluacija prisustva DNK nakon ekstrakcije, kao i produkti amplifikacije sa univerzalnim prajmerima nakon elektroforeze na agaroznom gelu su prikazani na Slikama 14, 15 i 16.



Slika 14. Izolacija DNK iz *Cercospora beticola* prema protokolu A: a) Izolovana DNK, b) Produkti amplifikacije sa univerzalnim prajmerima (250 - 250 ng  $\lambda$  DNA, 100 - 100 ng  $\lambda$  DNA, 50 - 50 ng  $\lambda$  DNA, L - 100 bp lestvica, 1-15 – izolati *C. beticola*, 16 - voda)



Slika 15. Izolacija DNK iz *Cercospora beticola* prema protokolu B: a) Izolovana DNK, b) Produkti amplifikacije sa univerzalnim prajmerima (50 - 50 ng  $\lambda$  DNA, 100 - 100 ng  $\lambda$  DNA, 250 - 250 ng  $\lambda$  DNA, L - 100 bp lestvica, 1-15 – izolati *C. beticola*, 16 - voda)



Slika 16. Izolacija DNK iz *Cercospora beticola* prema protokolu C: a) Izolovana DNK, b) Produkti amplifikacije sa univerzalnim prajmerima (25 - 25 ng  $\lambda$  DNA, L - 100 bp lestvica, 1-15 – izolati *C. beticola*, 16 - voda)

Koncentracija DNK je proverena i spektrofotometrijski (Tabela 9). Uočeno je da količina DNK nije u potpunosti odgovarala rezultatima na agaroznom gelu, što je posledica prisustva RNK.

Prema **Somma (2004)**, RNK se može uočiti na agaroznom gelu, dok to nije moguće primenom spektrofotometrije. U DNK koja je izolovana primenom protokola B, ove nečistoće nisu uočene (Slika 16a), te su koncentracije DNK bile približnije vrednostima koje su određene spektrofotometrijski (Tabela 9).

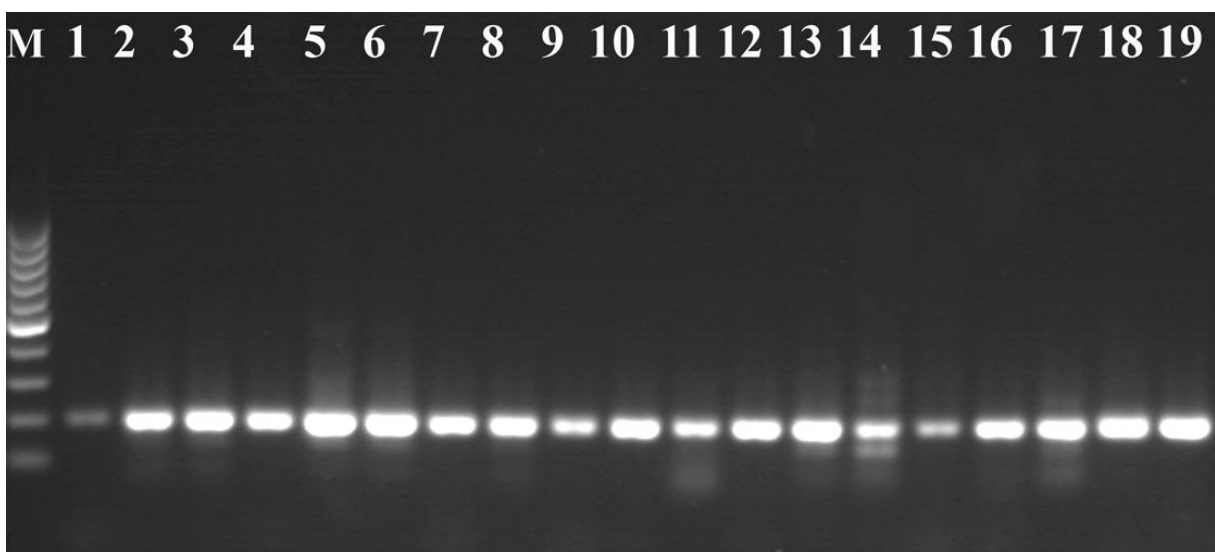
Tabela 9. Koncentracija i čistoća DNK uzoraka izolovanih prema protokolima za DNK izolaciju iz *Cercospora beticola*: A) Saghai-Marroof i sar. (1984), B) Weiland (1997) i C) Cenis (1992)

Broj uzorka	Protokol za izolaciju A			Protokol za izolaciju B			Protokol za izolaciju C		
	conc. (µg/µl)	260/280	260/230	conc. (µg/µl)	260/280	260/230	conc. (µg/µl)	260/280	260/230
1	1.70	1.6	1.1	1.42	1.6	1.3	0.88	1.8	1.3
2	0.77	1.7	1.3	0.30	1.5	0.1	0.29	1.7	1.1
3	0.71	1.6	1.1	0.57	1.7	0.2	0.44	1.9	1.5
4	0.78	1.7	1.2	0.55	1.5	1.1	0.56	1.8	1.3
5	0.87	1.5	1.0	0.78	1.5	1.3	0.53	1.9	1.5
6	0.88	1.7	1.3	1.53	1.8	1.6	0.86	1.8	1.6
7	1.18	1.8	1.2	0.96	1.8	1.5	0.94	1.7	1.2
8	0.81	1.4	1.0	0.47	1.6	1.3	1.29	1.8	1.5
9	0.65	1.5	0.6	0.34	1.3	0.9	0.71	1.8	1.5
10	0.25	1.4	0.9	0.38	1.6	1.3	0.18	1.6	0.9
11	1.78	1.6	1.1	0.26	1.5	1.1	0.17	1.7	1.0
12	1.05	1.6	1.1	1.62	1.8	1.4	0.90	1.5	0.9
13	1.81	1.6	1.2	2.58	1.5	1.2	0.21	1.4	0.8
14	2.09	1.7	1.2	1.21	1.7	1.4	0.18	1.3	0.8
15	0.27	1.4	0.9	0.34	1.6	0.1	0.18	1.3	0.7
Prosek	1.04	1.6	1.1	0.88	1.6	1.0	0.55	1.7	1.2

## CAPS markeri

Osam rezistentnih izolata *C. beticola* (CB80, CB254, CB538, CB543, CB546, CB591, CB605 i CB82), jedan umereno rezistentan (CB 603) i deset izolata osetljivih prema flutriafolu (CB94, CB257, CB322, CB33, CB157, CB369, CB152, CB587, CB270 i CB388) su odabrani za dalje analize C-14 alfa demetilaza gena (C-14 alpha demethylase gene) primenom CAPS markera.

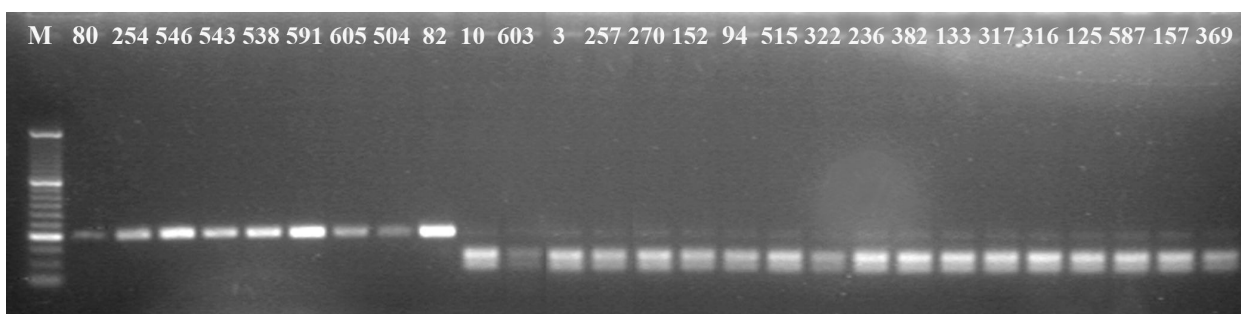
Nakon PCR reakcija sa specifičnim prajmerima za ovaj gen, kod svih izolata je dobijen produkt veličine 200 bp (Slika 17).



Slika 17. Amplifikacija produkata specifičnih prajmera za C-14 alfa demetilaza gen. Testirani izolati su: (1) CB80, (2) CB254, (3) CB538, (4) CB543, (5) CB546, (6) CB591, (7) CB605, (8) CB82, (9) CB587, (10) CB603, (11) CB94, (12) CB152, (13) CB257, (14) CB207, (15) CB322,

(16) CB33, (17) CB157, (18) CB369, (19) CB388. M = 100 bp GeneRulerTM447 ,  
Fermenatas.

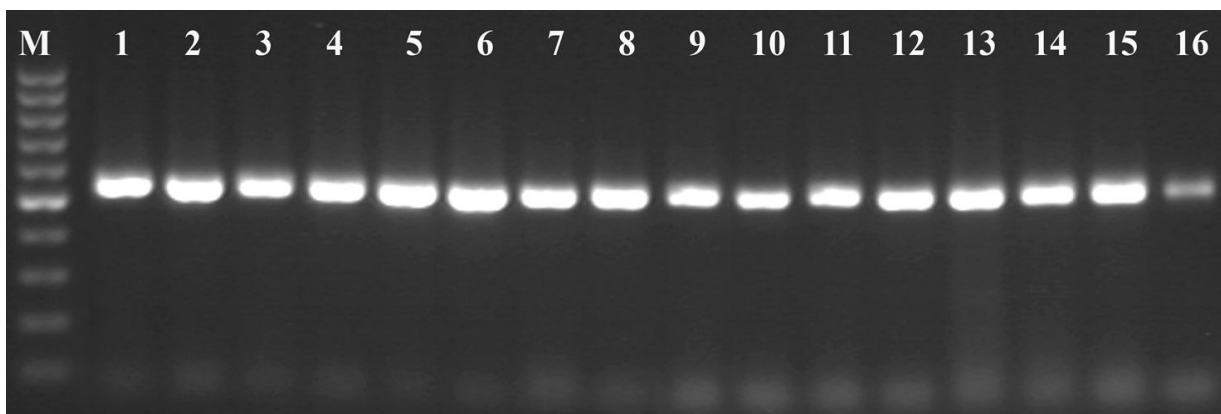
Nakon restrikcije sa enzimom Alw26I, kod izolata rezistentnih prema flutriafolu sa RP preko 70%, uočena je pojava samo jednog produkta dužine 200 bp. S druge strane kod osetljivih i umereno rezistentnih, restrikcija je rezultirala u dve vrste produkata dužine 80bp i 100 bp (Slika 18).



Slika 18. Detekcija rezistentnosti prema flutriafolu kod *C. beticola* primenom CAPS markera. Restrikcija C-14 alfa demetilaza gena sa Alw26I restrikcionim enzimom. Brojevi označavaju šifre izolata, M = DNA Ladder, Low Range, GeneRulerTM, Fermenatas;

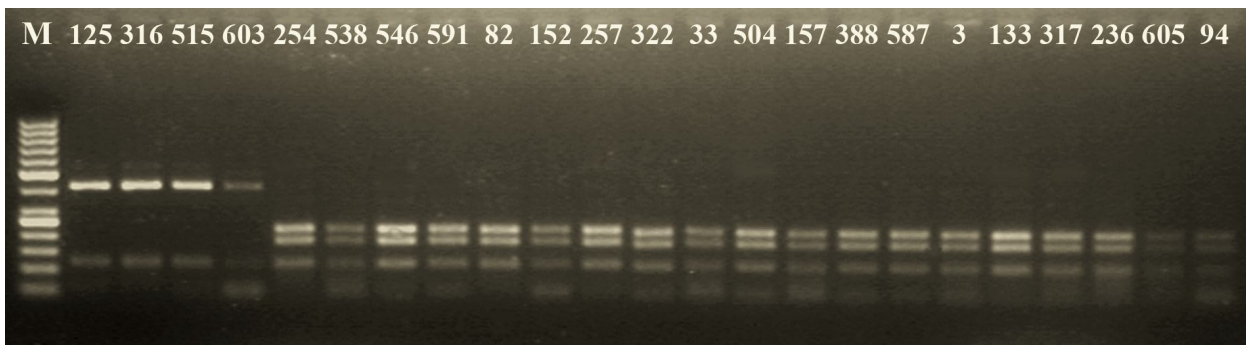
Za molekularnu detekciju rezistentnosti prema karbendazimu odabrano je četrnaest rezistentnih (CB254, CB538, CB543, CB546, CB591, CB605, CB82, CB94, CB257, CB322, CB33, CB504, CB157 i CB587) i četiri osetljiva izolata (CB125, CB 316, CB 515 i CB603) u

cilju analize  $\beta$ -tubulin gena. Kao rezultat amplifikacije produkata pomoću prajmera koji su specifični za  $\beta$ -tubulin gen, dobijeni su produkti koji su bili dugi 570 bp kod svih ispitivanih izolata (Slika 19).



Slika 19. Amplifikacija produkata specifičnih prajmera za  $\beta$ -tubulin gen. Testirani izolati su: (1) CB504, (2) CB538, (3) CB543, (4) CB546, (5) CB605, (6) CB94, (7) CB33, (8) CB254, (9) CB591, (10) CB82, (11) CB257, (12) CB322, (13) CB157, (14) CB587, (15) CB603, (16) CB125. M = 100 bp GeneRulerTM454 , Fermentas. M = 100 bp GeneRulerTM447 , Fermentas.

Digestijom umnoženog produkta primenom restriktivnog enzima Bsh1236I, dobijena su tri produkta različitih dužina kod rezistentnih izolata (250 bp, 200 bp i 120 bp), dok su kod osetljivih dobijena dva produkta dužine 450 bp i 120 bp (Slika 20).



Slika 20. Detekcija rezistentnosti prema benzimidazolu kod *C. beticola* primenom CAPS markera. Restrikcija fragmenta  $\beta$ -tubulin gena putem Bsh1236I restrikcionog enzima. Brojevi označavaju šifre izolata, M = DNA Ladder, Low Range, GeneRuler™, Fermentas;

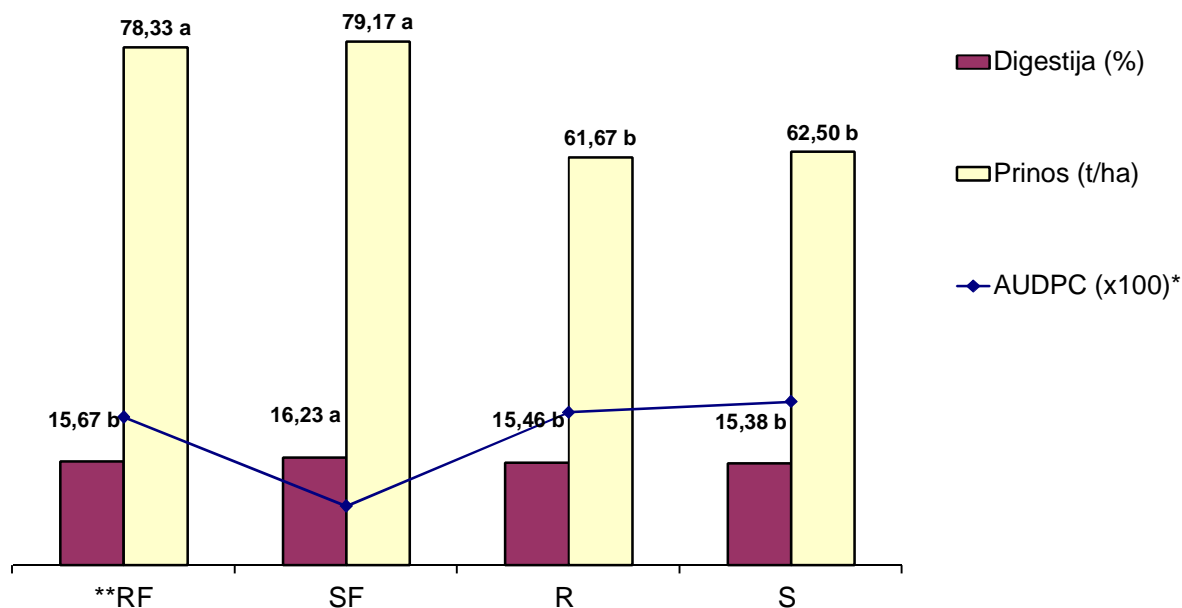
### ***Poljski ogledi***

Na osnovu rezultata *in vitro* ispitivanja osetljivosti *C. beticola* i na osnovu rezultata molekularnih analiza, izolati poznate osetljivosti prema flutriafolu su korišćeni u poljskim ogledima sa ciljem utvrđivanja efikasnosti fungicida. U svim ogledima tokom tri godine ispitivanja, nakon inokulacije bolest je napredovala veoma brzo zahvaljujući povoljnim agroekološkim uslovima, tačnije, visokim temperaturama i visokoj vlažnosti tokom jula, avgusta i početkom septembra. U trogodišnjim poljskim ogledima, prvi simptomi su se pojavili sedam dana nakon inokulacije, u momentu prvog fungicidnog tretiranja. Razvoj simptoma je bio uniforman u svim elementarnim parcelama, a pege su obrazovane dominantno na središnjem lišću u okviru rozete. U momentu druge ocene intenziteta oboljenja, crne strome



su se formirale u okviru pega. Bolest je tokom perioda ispitivanja najbrže napredovala u netretiranim kontrolnim varijantama, kao i na parcelama koje su inokulisane rezistentnim izolatima i tretirane fungicidima na koje je rezistentnost utvrđena.

Tokom 2009. godine, ispitana je efikasnost fungicida na bazi flutriafola u suzbijanju pegavosti lišća u uslovima veštačke inokulacije. Šećerna repa je inokulisana izolatima koji su osetljivi (CB 112, CB 115, CB 125, CB 135, CB 157, CB 171, CB 173, CB 346, CB 388 i CB 440) i rezistentni (CB 179, CB 253, CB 254, CB 538, CB 546, CB 551, CB 591, CB 605) prema flutriafolu i ocenjen je efekat hemijske zaštite ovim fungicidom.



Grafikon 13. Uticaj primene flutriafola na intenzitet oboljenja (AUDPC), prinos korena i digestiju u suzbijanju pegavosti lista šećerne repe prouzrokovane izolatima poznate osetljivosti (RF-rezistentni izolati tretirani flutriafolom, SF-osetljivi izolati tretirani flutriafolom,

R-inokulacija rezistentnim izolatima bez fungicida, S- inokulacija osetljivim izolatima bez fungicida).

Najviši intenzitet oboljenja je uočen u varijantama inokulisanim rezistentnim i osetljivim izolatima bez primene fungicida. Na istom nivou značajnosti bio je AUDPC kod tretmana sa inokulacijom rezistentnim izolatima sa primenom fungicida (Grafikon 13). Jedino je kod inokulacije osetljivim izolatima u kombinaciji sa aplikacijom flutriafolom došlo do značajnog smanjenja intenziteta oboljenja. Značajno niži prinos je izmeren u inokulisanim tretmanima bez primene fungicida (kontrola). Ostala dva tretmana, u kojim su osetljivi, odnosno, rezistentni izolati suzbijani flutriafolom je došlo do značajnog povećanja prinosa u odnosu na netretirane varijante. Sadržaj šećera je bio statistički značajno viši u varijanti inokulisanoj osetljivim izolatima tretiranoj flutriafolom, dok je u ostalim tretmanima registrovan značajno niži sadržaj šećera.

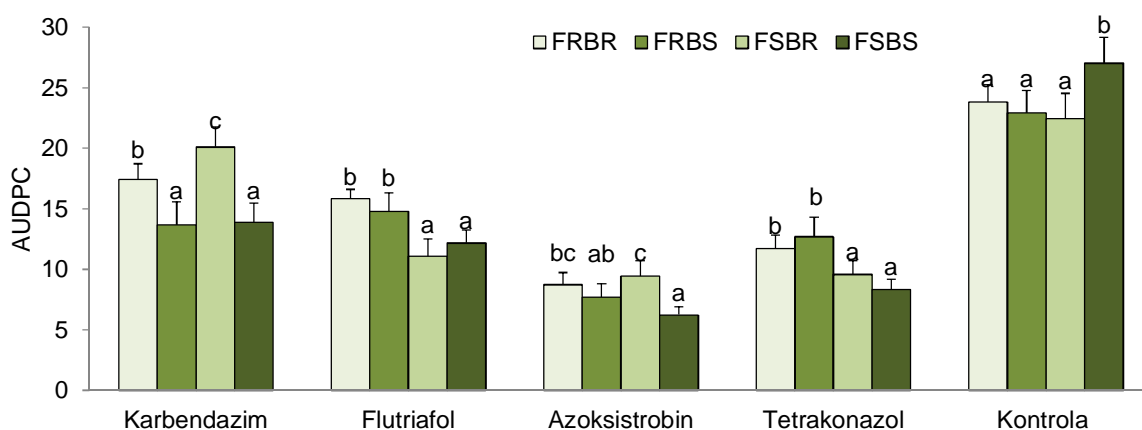
Rezultati poljskih ogleda koji su izvođeni tokom 2010 i 2011. godine su prikazani u Grafikonima 14 i 15. Odabir izolata *C. beticola* koji su korišćeni za inokulaciju izvršen je na osnovu rezultata *in vitro* testiranja osetljivosti prema fungicidima i molekularnih analiza primenom CAPS markera (Tabela 10).

Tabela 10. Izolati *Cercospora beticola* koji su korišćeni za inokulacije u poljskim ogledima u 2010 i 2011. godini

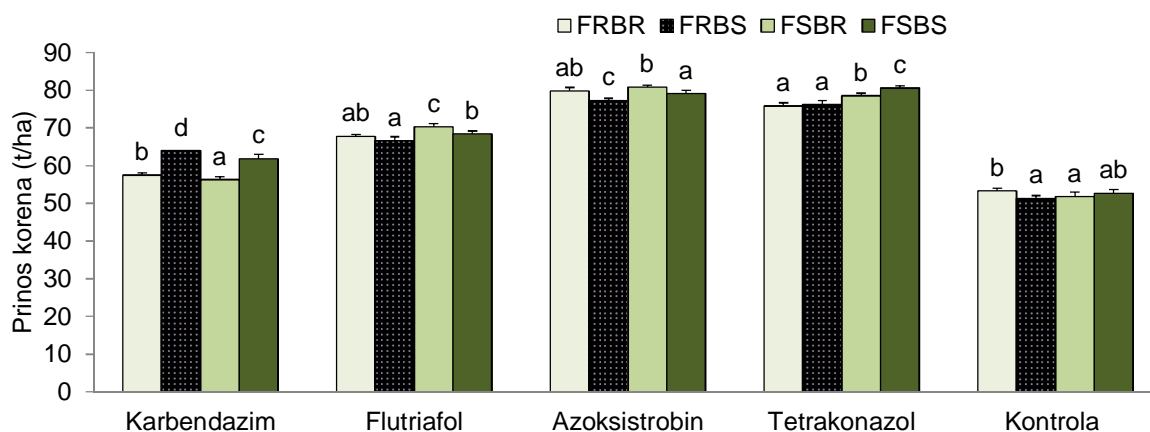
Osetljivost izolata <i>Cercospora beticola</i>	Šifre izolata
Rezistentni prema flutriafolu i karbendazimu (FRBR)	CB 72, CB 80, CB 84, CB 179, CB 253, CB 254, CB 412, CB 504, CB 523, CB 538, CB 543, CB 546, CB 551, CB 591, CB 600, CB 605
Umereno rezistentni prema flutriafolu i osetljivi prema karbendazimu (FRBS)	CB 603
Osetljivi prema flutriafolu i rezistentni prema karbendazimu (FSBR)	CB 1, CB 20, CB 33, CB 44, CB 50, CB 56, CB 74, CB 75, CB 112, CB 115, CB 135, CB 157, CB 165, CB 171, CB 173, CB 175, CB 183, CB 188, CB 191, CB 204, CB 206, CB 207, CB 292, CB 300, CB 316, CB 319, CB 369, CB 388, CB 425, CB 440, CB 526, CB 567, CB 577, CB 587, CB 596, CB 609
Osetljivi prema flutriafolu i karbendazimu (FSBS)	CB 125, CB 515

U obe godine ispitivanja, intenzitet oboljenja (AUDPC) je bio najviši u netretiranoj kontroli, dok je najniži AUDPC registrovan u varijantama s azoksistrobinom bez obzira na osetljivost izolata (Grafikon 14a i 15a). Tetrakonazol je u obe godine ispoljio bolju efikasnost od flutriafola, dok je karbendazim bio najmanje efikasan. U obe godine ispitivanja, intenzitet oboljenja je bio viši u tretmanima koji su inokulisani rezistentnim izolatima prema flutriafolu i karbendazimu i tretirani fungicidima koji odgovaraju rezistentnosti.

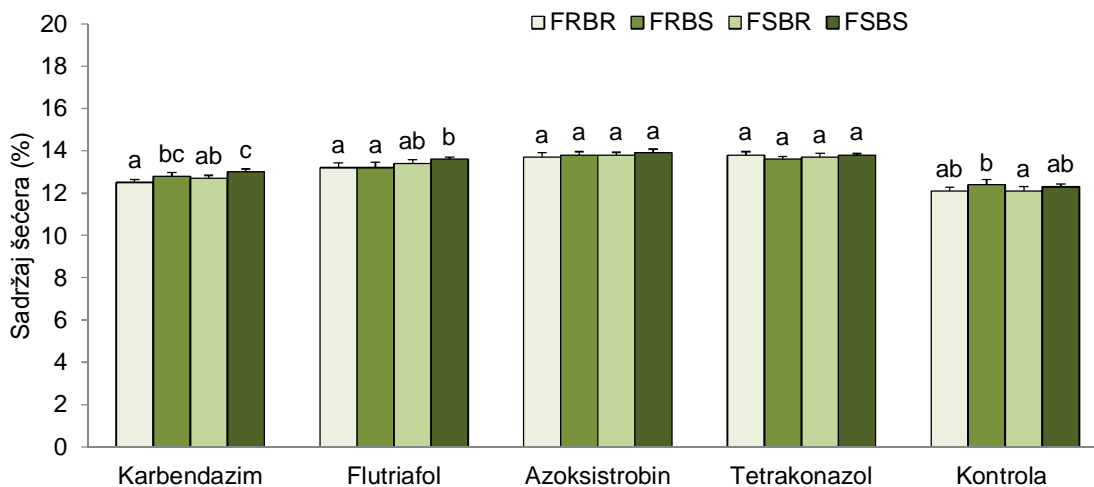
a)



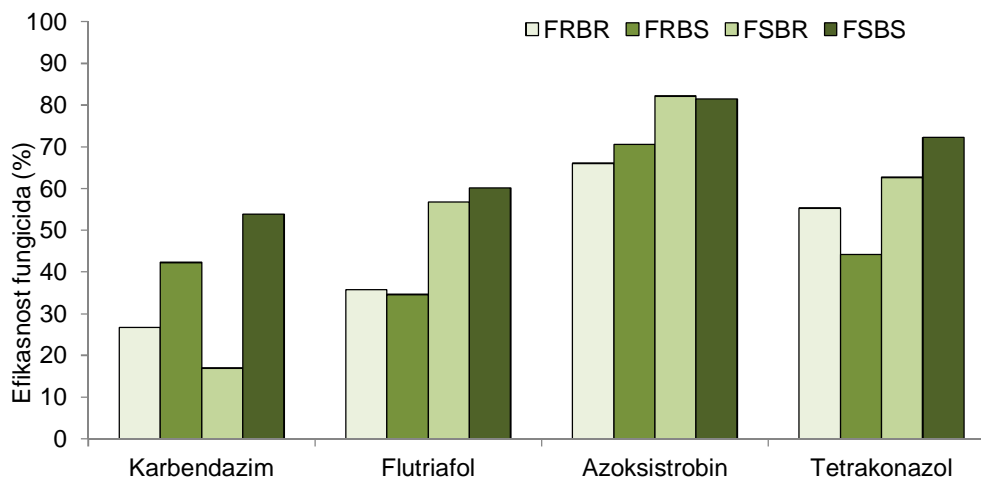
b)



c)

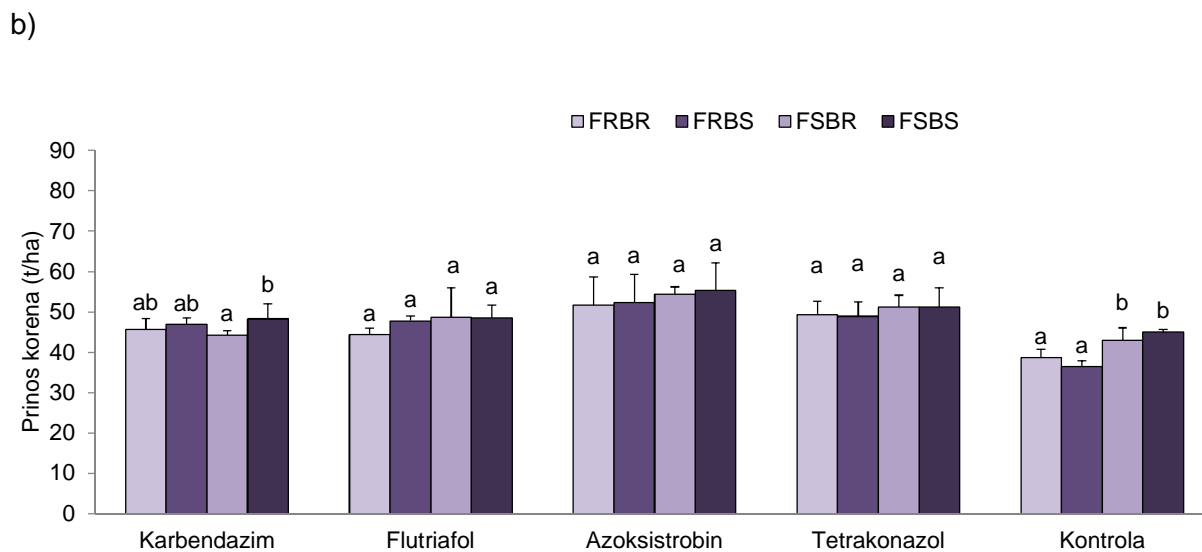
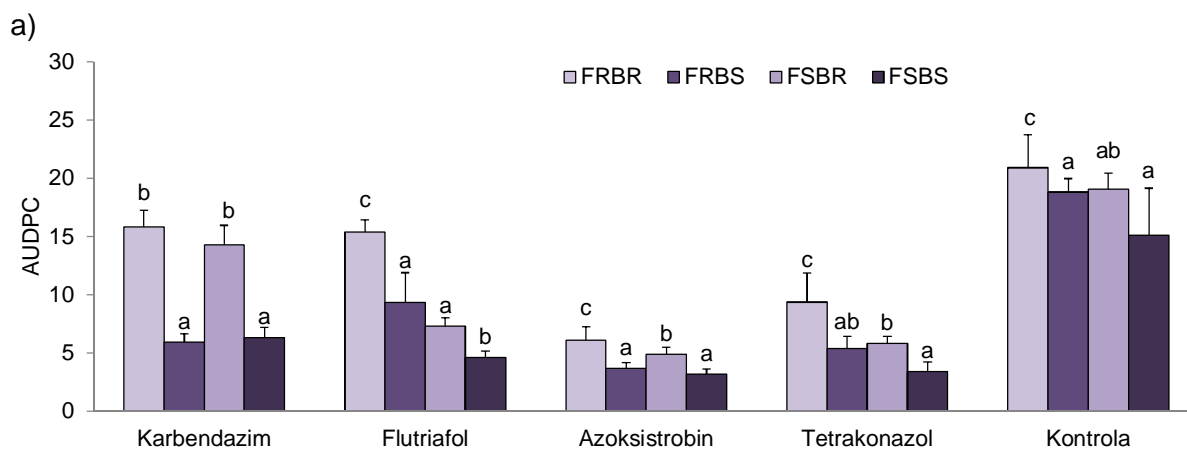


d)

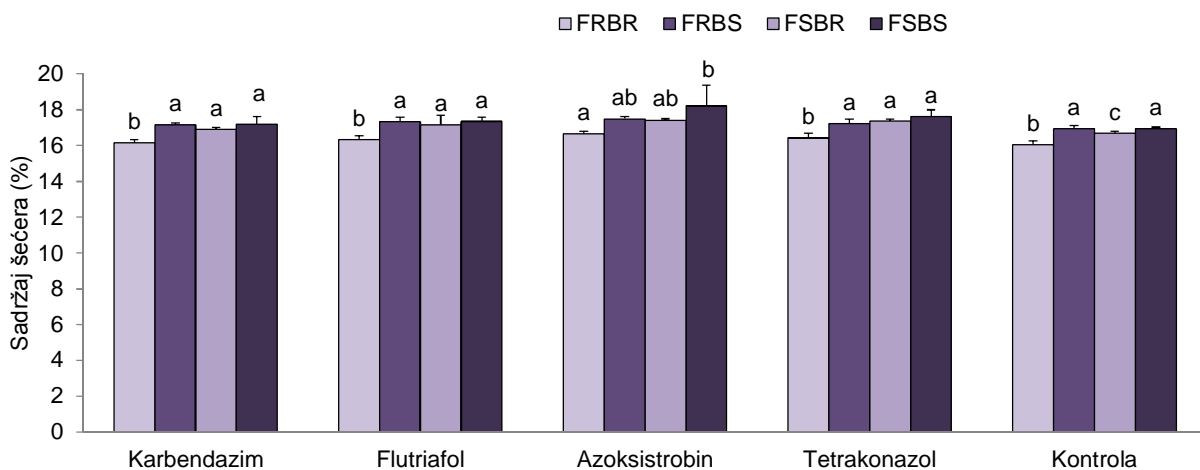


Grafikon 14. Efekat karbendazima, flutriafola, azoksistrobina i tetrakonazola u suzbijanju izolata *C. beticola* poznate osetljivosti u 2010. godini. Testirani parametri su: a) AUDPC, b) prinos korena, c) sadržaj šećera i d) efikasnost testiranih fungicida. Izolati: FRBR- Rezistentni prema flutriafolu i karbendazimu; FRBS- Umereno rezistentni prema flutriafolu i osetljivi

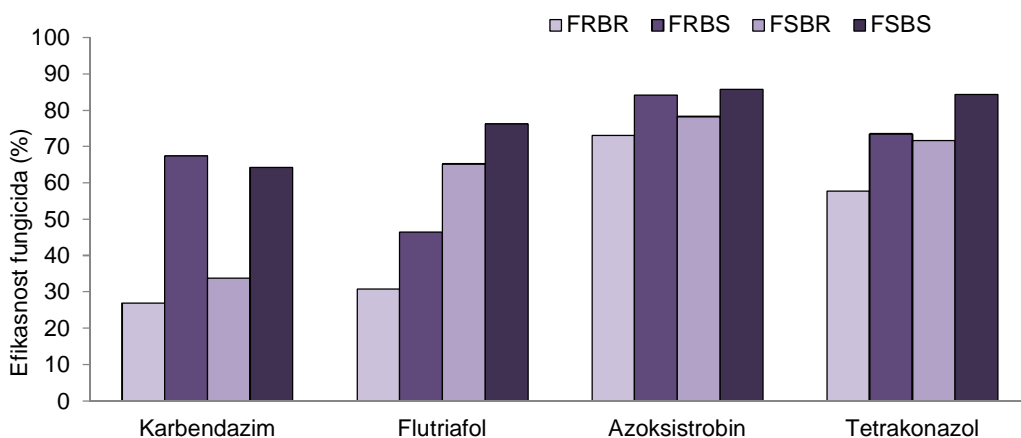
prema karbendazimu; FSBR- Osetljivi prema flutriafolu i rezistentni prema karbendazimu; FSBS- Osetljivi prema flutriafolu i karbendazimu. Iznad stubića na grafikonima a)-c) prikazana je standardna devijacija.



c)



d)



Grafikon 15. Efekat karbendazima, flutriafola, azoksistrobina i tetrakonazola u suzbijanju izolata *C. beticola* poznate osetljivosti u 2011. godini. Testirani parametri su: a) AUDPC, b) prinos korena, c) sadržaj šećera i d) efikasnost testiranih fungicida. Izolati: FRBR- Rezistentni prema flutriafolu i karbendazimu; FRBS- Umereno rezistentni prema flutriafolu i osetljivi prema karbendazimu; FSBR- Osetljivi prema flutriafolu i rezistentni prema karbendazimu; FSBS- Osetljivi prema flutriafolu i karbendazimu. Iznad stubića na grafikonima a)-c) prikazana je standardna devijacija.

Prinos korena je u obe godine bio najniži u tretmanima bez hemijske zaštite, bez obzira na osetljivost izolata (Grafikon 14b i 15b). U 2010 godini, kod primene karbendazima, niži prinos je izmeren u tretmanima sa rezistentnim izolatima prema ovom fungicidu. Isti princip je registrovan i u 2011. godini, ali bez značajnih razlika.

Pored netretirane kontrole, sadržaj šećera je bio najniži u tretmanima karbendazimom i flutriafolom, koji su inokulisani izolatima rezistentnim prema oba fungicida (FRBR) (Grafikon 14c i 15c). Isti slučaj zabeležen je u 2010. godini kod parcela inokulisanim izolatima rezistentnim prema flutriafolu, a osetljivim prema karbendazimu (FRBS) koje su tretirane flutriafolom. U 2010. godini, nisu postojale razlike u sadržaju šećera u varijantama sa primenom azoksistrobina i tetrakonazola nezavisno od osetljivosti izolata kojima su inokulisani.

Kod tretmanima sa aplikacijom karbendazimom i flutriafolom, efikasnost je bila veoma niska kod parcela koje su inokulisane izolatima rezistentnim prema ova dva fungicida (Grafikon 14d i 15d). Zaštita azoksistrobinom je bila podjednako uspešna kod svih inokulisanih parcela s obzirom da efikasnost nije padala ispod 70% kod svih inokulisanih parcela bez obzira na osetljivost izolata.



## DISKUSIJA

Pojava rezistentnosti prema fungicidima kod prouzrokovana pegavosti lišća šećerne repe, *Cercospora beticola*, predstavlja najvažniji ograničavajući faktor u suzbijanju ove bolesti u svim zemljama s povoljnim agroekološkim uslovima – toplim i vlažnim mesecima tokom druge polovine vegetacije šećerne repe. U ovakvim uslovima dolazi do pojave oboljenja u visokom intenzitetu, do intenzivne sporulacije patogena, što u kombinaciji sa policikličnom prirodom oboljenja i primenom većeg broja tretiranja fungicidima tokom vegetacije, čine najvažnije faktore za pojavu rezistentnosti prema fungicidima (**Karaoglanidis i sar., 2003**).

Rezultati proučavanja odgajivačkih karakteristika 102 izolata *Cercospora beticola* koji su prikupljeni sa 59 lokaliteta u Vojvodini su pokazali da su izolati veoma varijabilni u brzini porasta, kao i u boji i teksturi kolonija na sve tri testirane podloge: krompir dekstroznom agaru, sladnom agaru i czapek-ovoj podlozi. Slične rezultate objavili su **Moretti i sar. (2004)** koji su ispitivali malu populaciju od 10 izolata, ali nisu uspeli da grupišu izolate na osnovu poređenja morfoloških, odgajivačkih karakteristika, patogenosti, produkcije fitotoksina, RAPD i DAMD analiza genoma. Postojanje fizioloških i morfoloških razlika između izolata *C. beticola* koji potiču iz udaljenih geografskih regiona su ranije opisali **Ruppel (1972)**, **D'Ambra i sar. (1974)** i **Pal i Mukhopadhyay (1984)**. Rezultati **Canova (1959)** i **Moretti i sar. (2004)** su utvrdili veliku varijabilnost u morfološkim i odgajivačkim osobina između malog broja izolata koji potiču iz iste pege. Odsustvo korelacije između porasta micelije na KDA i geografskog porekla izolata su konstatovali **Moretti i sar. (2006)**. Postojanje negativne korelacije između

porasta i rezistetnosti izolata prema tetraokonazolu nije uočeno u ovom istraživanju, iako je ranije opisano od strane drugih autora **(Moretti i sar., 2004)**.

Utvrđivanje nivoa osetljivosti fitopatogenih gljiva prema fungicidima i detekcija rezistentnosti u populaciji gljiva predstavlja jedan od najvažnijih činilaca antirezistentne strategije **(Karaoglanidis i sar., 2003)**. Povećanje broja rezistentnih jedinki u okviru jedne populacije ima za posledicu smanjenje efikasnosti fungicida primenjenih u preporučenim dozama, ili u krajnjem slučaju do potpunog gubitka efikasnosti, kao što se desilo kod fungicida iz grupe benzimidazola **(Karaoglanidis i Ioannidis, 2010)**. Generalno posmatrano, pojava rezistentnosti prema fungicidima je ograničavajući faktor u efikasnoj i održivoj kontroli *C. beticola* u svim regionima gajenja šećerne repe. S obzirom da je pravovremena kontrola osnova za uspešno suzbijanje oboljenja, za efikasnu primenu fungicida u programima zaštite, neophodno je utvrditi da li se rezistentnost pojavila i u kojoj meri **(Hanson, 2010)**. Brza identifikacija rezistentnosti prema fungicidima doprinosi ispitivanju i uvođenju novih metoda u suzbijanju oboljenja, kao i odabiru drugih fungicida za suzbijanje oboljenja u regionima sa registrovanom smanjenom osetljivošću.

Prvi sistemični fungicidi koji su primenjivani u suzbijanju *C. beticola* bili su na bazi benomila iz grupe benzimidazola. Nakon pojave rezistentnosti, udeo rezistentnih izolata u populaciji gljive kretao se od 80 do 90% **(Georgopoulos i Dovas, 1973)** i ovi fungicidi su povučeni iz primene **(Karaoglanidis i sar., 2003)**. S obzirom da su u ovom istraživanju svi testirani referentni izolati rasli na podlozi sa karbendazimom u koncentracijama od 1, 2, 4, 5, 8, 10, 16, 20, 32 i 50 µg/mL, za testiranje kvalitativne osetljivosti primenom diskriminativne koncentracije je uzeto 5 µg/mL **(Davidson i sar., 2006)**. Ovo je opravdano zbog kvalitativne

prirode rezistentnosti *C. beticola* prema fungicidima iz grupe benzimidazola kod kojih se na ovoj koncentraciji javlja jasna razlika između rezistentnih i osetljivih izolata, koji uopšte ne rastu na podlozi s 5 µg/mL, čak ni posle dužeg perioda inkubacije (**Weiland i Halloin, 2001; Karaoglanidis i Ioannidis, 2010**). Rezultati ispitivanja kvalitativne osetljivosti izolata iz Vojvodine su pokazali da su skoro svi testirani izolati (95.9%) bili rezistentni prema karbendazimu. Ovo je u skladu sa predviđanjima **Ruppel (1975)** i **Dovas i sar. (1976)** da će zastupljenost rezistentnih izolata biti stabilna karakteristika s obzirom na jednake konkurentske sposobnosti rezistentnih i osetljivih izolata. Dodatno, u našoj zemlji, benzimidazoli nikad nisu u potpunosti izbačeni iz upotrebe, iako je njihova upotreba značajno smanjena od detekcije rezistentnosti u našoj zemlji i regionu (**Marić i sar., 1976**). Naši rezultati ukazuju na to da je, kao posledica takve prakse u zaštiti šećerne repe, zastupljenost izolata koji su rezistentni prema benzimidazolima porasla tokom vremena i da su danas oni predominantni u populaciji *C. beticola* u regionu gajenja šećerne repe u našoj zemlji. Visoka zastupljenost ovih izolata je takođe posledica izražene sposobnosti ovih izolata da prežive dejstvo fungicida i temperaturne uslove (**Trkulja i sar., 2013**). Prema FRAC-u, kada jednom populacija izolata rezistentnih prema benzimidazolima dostigne visok nivo ostaje stabilna duže vreme, tako da ni uvođenje kombinacija fungicida na bazi benzimidazola s aktivnim materijama drugog mehanizma delovanja nema efekta (**Brent i Hollomon, 2007a**). Upotreba fungicida na bazi benzimidazola u svetu je i dalje na visokom nivou, iako se rezistentnost pojavila još tokom 1970-tih. U odsustvu podataka za većinu fitopatogenih gljiva, veoma je teško proceniti koliko su fungicidi na bazi benzimidazola i dalje efikasni i da li je i opravdana primena u ovom obimu. Kada je u pitanju *C. beticola*, veći broj studija sprovedenih u našoj zemlji su utvrdile da je zastupljenost izolata koji su rezistentni prema benzimidazolima u

pojednim lokalitetima veoma visoka (**Gavran, 1991, 1992**). **Trkulja i sar. (2012)** registrovali su preko 90% rezistentnih izolata u ispitivanoj populaciji, čak i na lokalitetima gde benzimidazoli nikad nisu primenjivani. S druge strane **Karaoglanidis i sar. (2003)** su objavili rezultate istraživanja u kojem je nakon prekidanja primene benzimidazola u periodu od preko 25 godina zastupljenost populacije rezistentnih izolata smanjena 3-4 puta. Ipak, već nakon nekoliko godina primene benzimidazola pri samo jednom tretiranju godišnje, došlo je do selekcije rezistentnih izolata i dostizanja prvobitnog nivoa koji se javio po detekciji rezistentnosti 1970-tih.

Pored primene diskriminativne koncentracije od 5 µg/mL hranljive podloge u *in vitro* istraživanjima, rezistentnost izolata se može detektovati i primenom CAPS markera. **Davidson i sar. (2006)** su detektovali da svi osetljivi izolati imaju sekvencu GAG (Glu) na kodonu 198 β tubulin gena, dok su rezistentni izolati imali GCG (Ala) na ovoj poziciji. Svi izolati koji sa ovom mutacijom su imali efektivnu dozu za smanjenje 50% porasta (ED<sub>50</sub>) preko 60 µg/mL. Ova mutacija se najčešće vezuje za rezistentnost prema benzimidazolima (**Qiu i sar., 2011**), je pronađena i kod drugih vrsta *Ascomycota* (**Fujimura i sar., 1992; Cooley i Caten, 1993; Koenraad i sar., 1992; Yarden i Katan, 1993; Luck i Gillings, 1995; Butters i Hollomon, 1999; Albertini i sar., 1999; Ma i sar., 2003; Cannas-Gutierrez i sar., 2006; Maymon i sar., 2006; Chung i sar., 2010**). Pored ove mutacije, rezistentnost prema benzimidazolima se vezuje i za promene na kodonu 200 β tubulin gena (**Koenraad i Jones, 1993; Butters i Hollomon, 1999**). Smatra se da je veći broj mutacija β tubulin gena karakterističan za populaciju *C. beticola* koja je evropskog porekla, dok je kod populacije gljive sa američkog kontinenta utvrđeno postojanje samo jedne mutacije (izolati su prikupljeni

u nekoliko država tokom višegodišnjeg perioda) – **Karaoglanidis i Ioannidis (2010)**. **Trkulja i sar. (2013)** su kod populacije *C. beticola* iz Srbije detektovali izolate koji su slabo i umereno osetljivi prema benzimidazolima. Obe ove grupe izolata su imale mutaciju na kodonu 167  $\beta$  tubulin gena (Phe→Tyr).

DMI fungicidi se u našoj zemlji intenzivno primenjuju u suzbijanju *C. beticola* samostalno, ili u kombinaciji sa protektivnim fungicidima, benzimidazolima, strobilurinima, ili drugim triazolima. Smanjena osetljivost i rezistentnost izolata *C. beticola* iz Srbije prema flutriafolu je i ranije registrovana u Srbiji (**Balaž i sar., 1995**). Diskriminativna koncentracija od 1.25  $\mu\text{g/mL}$ , koja je korišćena u ovom istraživanju, je približna srednjoj  $EC_{50}$  vrednosti osetljivih izolata koju su utvrdili **Karaoglanidis i sar. (2003)**. Za tetraokonazol je diskriminativna koncentracija bila niža i iznosila je 0.6  $\mu\text{g/mL}$ . Zastupljenost izolata kod kojih je detektovana rezistentnost na flutriafol je iznosila 16.3%, a na tetraokonazol 9.2%. Ovo ukazuje na postojanje ukrštene rezistentnosti prema DMI fungicidima, koja u perspektivi može postati jedan od najznačajnijih problema u suzbijanju pegavosti lista šećerne repe koju prouzrokuje *C. beticola*. Kako se *C. beticola* prenosi lokalno, odnosno, inokulum se ne prenosi na veće udaljenosti (**Bolton i sar., 2013**), može se zaključiti da je do pojave rezistentnosti došlo na svakom lokalitetu posebno. Svi izolati koji su bili rezistentni prema flutriafolu bili su umereno, ili visoko rezistentni i prema tetrakonazolu i rezistentni prema karbendazimu, što je prema našim saznanjima prvi slučaj trostruke rezistentnosti kod *C. beticola*.

U cilju ocene osetljivosti većeg broja izolata prema flutriafolu, bez izvođenja *in vitro* testova za ocenu osetljivosti, primenjeni su CAPS markeri da bi se razdvojili osetljivi od rezistentnih izolata. Rezultati za flutriafol su potvrdili pretpostavke **Nikou i sar. (2009)** da se mutacija na

poziciji 169 C14 alfa demetilaza gena, može detektovati putem CAPS i koristiti kao marker za identifikaciju izolata *C. beticola* koji su pokazali rezistentnost putem testova na hranljivim podlogama kojima je dodat flutriafol. Širok spektar nivoa osetljivosti koji se ispoljava relativnim porastom micelije koji varira od potpune inhibicije do porasta koji prevazilazi kontrolu bez fungicida, ukazuje da je ova osobina kvantitativna, odnosno kontrolisana velikim brojem različitih gena.

Prema **Nikou i sar. (2009)**, mutacija na C-14 alfa demetilasa genu se može primenjivati za detekciju izolata *C. beticola* koji su visoko rezistentni prema flutriafolu. Za razliku od ovih autora, **Bolton i sar. (2012)** smatraju da polimorfizam kod CbCyp51 gena nije povezan sa povećanjem rezistentnosti *C. beticola* prema DMI fungicidima. Kod naših istraživanja, primena CAPS markera za detekciju opisane mutacije se pokazala uspešnom za izdvajanje izolata koji su visoko rezistentni prema flutriafolu. Iako CAPS marker za rezistentnost prema flutriafolu nije funkcionalno povezan sa ispoljavanjem rezistentnosti, rezultati našeg istraživanja pokazuju da se ova metoda može uspešno primenjivati za detekciju rezistentnosti prema flutriafolu kod izolata *C. beticola* u Srbiji.

Rezultati poljskih oglada u sve tri godine ispitivanja ukazuju na postojanje značajne pozitivne korelacije između nivoa osetljivosti izolata *C. beticola* prema svim ispitivanim fungicidima (karbendazimu, flutriafolu, tetrakonazolu i azoksistrobinu) i efikasnosti fungicida u poljskim ogleđima. Odsustvo efikasne kontrole izolata rezistentnih prema karbendazimu i/ili flutriafolu je uslovalo smanjenje prinosa korena, kao i sadržaja šećera. U slučaju karbendazima i flutriafola, sadržaj šećera na elementarnim parcelama koje su inokulisane rezistentnim

izolatima i tretirane fungicidima koji odgovaraju rezistentnosti bio je na istom nivou značajnosti kao sadržaj šećera u netretiranim varijantama.

Tokom poljskih ogleda 2010 i 2011. godine, efikasnost fungicida je u svim tretmanima bila niska, što se može objasniti ekstremno povoljnim uslovima za razvoj pegavosti lišća (*C. beticola*) tokom jula i avgusta, kao i visokim infektivnim pritiskom parazita u uslovima veštačkih inokulacija. Maksimum efikasnosti je registrovan u tretmanima azoksistrobinom u parcelama sa inokulacijom FSBR i FSBS (redom 82.2 i 81.5%). Azoksistrobin je pokazao visoku efikasnost u suzbijanju *C. beticola*, što je i očekivano s obzirom na višestruki efekat koji fungicidi iz ove grupe imaju na prouzrokovača pegavosti lišća šećerne repe, a to su inhibicija klijanja spora i eradikativan i kurativni efekat (**Anesiadis i sar., 2003**). Rezultati ispitivanja **Karaoglanidis-a i Bardas-a (2006)** su pokazala da trifloksistrobin i piraklostrobin uspešno suzbijaju isolate koji su rezistentni prema benzimidazolima i DMI fungicidima. U uslovima veštačkih inokulacija sa rezistentim izolatima prema benzimidazolima i DMI, utvrđeno je da je i najniža koncentracija oba testirana strobilurina obezbedila uspešnu kontrolu pegavosti lišća, dok primenom benomila (benzimidazol) i difenokonazola (DMI) nije efikasno suzbijeno oboljenje prouzrokovano izolatima odgovarajuće rezistentnosti. Treba napomenuti da je u pomenutom istraživanju dobra efikasnost u suzbijanju pegavosti lišća šećerne repe ostvarena primenom strobilurinskih preparata u kombinaciji sa benomilom ili difenokonazolom. Uspešno suzbijanje pegavosti lišća primenom azoksistrobina u ovom istraživanju je opravdano zbog odsustva ukrštene rezistentnosti između strobilurina i DMI fungicida, što je potvrđeno i kod drugih parazita (**Ma i sar., 2003; Karaoglanidis i Bardas, 2006**).

Fungicidi na bazi aktivnih materija koje spadaju u hemijsku grupu triazola su u našoj zemlji široko primenjivani u suzbijanju pegavosti lišća šećerne repe, koju prouzrokuje *C. beticola*. Fungicidi koji pripadaju istoj hemijskoj grupi i imaju isti mehanizam delovanja mogu razviti ukrštenu rezistentnost, koja je već poznata kod nekih triazolskih fungicida (**Karaoglanidis i Thanassouloupoulos, 2003**). U *in vitro* ogledima testiranja osetljivosti izolata prema tetrakonazolu je registrovana veća osetljivost izolata. Kod referentne populacije, prosečan  $EC_{50}$  iznosio 0.48  $\mu\text{g/mL}$  tetrakonazola, odnosno 0.80  $\mu\text{g/mL}$  flutriafole. U ovim eksperimentima je registrovana viša efikasnost tetrakonazola u suzbijanju izolata koji su rezistentni prema flutriafolu u poljskim ogledima. Iako ukrštena rezistentnost postoji između fungicida koji spadaju u grupu DMI fungicida, takođe je poznato da različiti DMI fungicide mogu imati različit način delovanja, što rezultira različitim mehanizmom rezistentnosti kod ciljanog organizma (**Karaoglanidis i Ioannidis, 2010**). Razlike u efikasnosti se takođe mogu objasniti poligenomskom kontrolom rezistentnosti prema DMI fungicidima, kao i relativno stabilnom osetljivošću *C. beticola* prema tetrakonazolu (**Secor i sar., 2010**). Efikasnost flutriafole je bila izuzetno niska u tretmanima koji su inokulisani rezistentnim, ili umereno rezistentnim izolatima (FRBR ili FRBS). Tetrakonazol je obezbedio dobru zaštitu useva od *C. beticola* koja je rezultirala u visokom prinosu i sadržaju šećera, što je registrovano i kod drugih autora (**Khan i Smith, 2005**).

Efikasnost karbendazima je bila vrlo niska na parcelama koje su bile inokulisane izolatima koji su bili rezistentni prema ovom fungicidu, što je u skladu sa kvalitativnom prirodom rezistentnosti prema benzimidazolima. Rezultati detekcije rezistentnosti prema karbendazimu



primenom CAPS markera su bili u skladu sa rezultatima *in vitro* testova, koji su takođe potvrđeni u poljskim ogledima.

Detekcija i utvrđivanje nivoa rezistentosti populacije *C. beticola* prema fungicidima doprinosi signaliziranju promene osetljivosti i pre nego što dođe do smanjenja efikasnosti fungicida u praksi. Ovakva istraživanja bi trebala pomoći uspostavljanju i uvođenju novih strategija za prevenciju pojave rezistentnosti u cilju uspešne kontrole pegavosti lišća koju prouzrokuje *C. beticola*. Ispitivanja nivoa osetljivosti populacije nekog patogena prema fungicidima koji se koriste za njegovo suzbijanje predstavljaju najvažniji faktor u antirezistentnoj strategiji (**Karaoglanidis i sar., 2003**). Povećanje dela populacije parazita koji je rezistentan prema fungicidima uslovljava nemogućnost primene datog fungicida zbog gubitka njegove osetljivosti, kao što se desilo sa fungicidima iz grupe benzimidazola (**Karaoglanidis i Ioannidis, 2010**).

Da bi se što duže očuvala efikasnost postojećih fungicida, neophodno je strogo primenjivati mere antirezistentne strategije, naročito kod parazita kod kojih je utvrđena pojava smanjene osetljivosti i povećane rezistentnosti prema svim sistemskim fungicidima koji se primenjuju za suzbijanje (**FRAC, 2013**). U cilju rešavanja problema rezistentnosti predlaže se izbegavanje samostalne upotrebe fungicida, primena fungicida sa različitim mehanizmom delovanja, primena fungicida u preporučenim dozama, integralna zaštita bilja i druge mere antirezistentne strategije (**Brent i Hollomon, 2007b**). U slučaju da do pojave rezistentnosti dođe, biće neophodno uvoditi nove aktivne materije sa različitim mehanizmom delovanja od postojećih, a smatra se da će ovo biti težak posao zbog velikih troškova vezanih za

istraživanja i uvođenja u primenu, kao i zbog nedostatka novih struktura molekula koji bi mogli postati pesticidi sa novim mehanizmom delovanja (**Ishii, 2006**).

## ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja, mogu se izvesti sledeći zaključci:

Ispitivani izolati *Cercospora beticola* iz Vojvodine u pogledu morfoloških i odgajivačkih osobina ispoljavaju visok stepen heterogenosti. Najveća varijabilnost u pogledu boje i teksture kolonije je uočena na Krompir dekstroznom i sladnom agaru, a najmanja na Czapek-ovoj podlozi.

Kada je u pitanju boja kolonije, na krompir dekstroznom i sladnom agaru najveći broj izolata je formirao svetlo sive kolonije sa ili bez tamno sivog oboda sa granuloznom ili somotastom teksturom. Na Czapek-ovoj podlozi izolati su obrazovali tamno ili svetlo maslinasto zelenu miceliju sa granuloznom ili somotastom teksturom.

Najbrži porast izolata ostvaren je na KDA, a najmanji na Czapek-ovoj podlozi. Značajno najsporiji porast imali su izolati CB 133 (KDA), CB 600 (SA) i CB 322, CB 382 (CZ), dok je najbrži porast na svim testiranim podlogama imao izolat CB 561.

Na bazi laboratorijskih istraživanja, prosečne vrednosti  $EC_{50}$  referentne populacije *Cercospora beticola* iznosile su za: karbendazim preko 50  $\mu\text{g/mL}$ , flutriafol 0.8  $\mu\text{g/mL}$ , tetraokonazol 0.48  $\mu\text{g/mL}$  i za azoksistrobin 0.012  $\mu\text{g/mL}$ . Za diskriminativne koncentracije ovih fungicida su na osnovu vrednosti  $EC_{50}$  određene sledeće koncentracije: flutriafol 1.25  $\mu\text{g/mL}$ , tetraokonazol 0.6  $\mu\text{g/mL}$  i azoksistrobin 0.1  $\mu\text{g/mL}$ . Jedino je za karbendazim određena

diskriminativna koncentracija od 5 µg/mL, što je opravdano zbog kvalitativne prirode otpornosti prema ovom fungicidu.

*In vitro* testiranjem kvalitativne osetljivosti 98 izolata prema karbendazimu, utvrđeno je da 95.90% izolata ispoljava rezistentnost, a 4.10% izolata osetljivost prema ovom fungicidu. Kada je u pitanju flutriafol, osetljivo je bilo 35.70% izolata, umereno osetljivo 37.80%, a rezistentno je bilo 26.50% izolata (10.20% umereno i 16.30% visoko rezistentnih). Osetljivost prema tetraokonazolu je bila veća nego prema flutriafolu, te je osetljivo bilo 75.50% izolata, 7.10% je imalo smanjenu osetljivost, dok je 9.20% bilo visoko rezistentno. U testiranju osetljivosti prema azoksistrobinu, 30 odabranih izolata je bilo osetljivo prema ovom fungicidu.

Najviši prinos DNK je dobijen primenom protokola prema Saghai-Marroof i sar. (1984). Dobar potencijal je pokazao i protokol za izolaciju DNK prema Cenis (1992) kod kojeg je uspešno amplifikovano 87% uzoraka i koji ne zahteva ekstrakciju hloroformom ili tečnim azotom. Analiza CAPS markerima u cilju detektovanja rezistentnosti prema flutriafolu i karbendazimu je u potpunosti odgovarala rezultatima *in vitro* ispitivanja osetljivosti izolata.

Izolati koji su pokazali rezistentnost prema flutriafolu i karbendazimu *in vitro*, su u poljskim ogleđima uspešno suzbijani fungicidima na bazi tetraokonazola i azoksistrobina, koji su obezbedili visok prinos i sadržaj šećera. Karbendazim i flutriafol su bili nedovoljno efikasni u suzbijanju izolata sa odgovarajućom rezistentnosti. Izolati koji su bili osetljivi prema karbendazimu i flutriafolu su se podjednako uspešno kontrolisali svim ispitivanim fungicidima.

Prinos korena i sadržaj šećera je u sve tri godine ispitivanja bio značajno viši u varijantama koje su bile inokulisane osetljivim izolatima i tretirane odgovarajućim fungicidima. Tokom

poljskih ogleda u 2010 i 2011. godini, najviši prinos korena i sadržaj šećera je ostvaren sa primenom azoksistrobina.

Ovo istraživanje ukazuje na značaj praćenja promena u osetljivosti populacije *Cercospora beticola* prema dominantno korišćenim aktivnim materijama na našem proizvodnom području. S obzirom da su sistemski fungicidi koji se primenjuju za suzbijanje na FRAC-ovoj listi srednje, ili visoko rizičnih za pojavu rezistentnosti, može se očekivati da i u budućnosti dođe do promene u sastavu populacije parazita, odnosno do povećanja udela rezistentnih izolata. Njihova predominacija u poljskoj populaciji ovog parazita može dovesti do značajnih gubitaka u prinosu korena šećerne repe, kao i sadržaju šećera, ali i do većih ekonomskih gubitaka usled aplikacije fungicida kod kojih izostaje potrebna biološka efikasnost.

# PRILOZI

## Prilog 1.

### Restrikciona mapa gena za $\beta$ -tubulin osetljivog izolata *C. beticola*

GenBank:  $\beta$ -tubulin gen Izolat C-3 (AY856373)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=61678002>

[Graphic map](#) | [Table by enzyme name](#)

```

MvnI BsiYI SduI Cac8I Bsh1236I
Bsc4I PflMI AflIII ThaI AccII
HinfI MnlI AciI MwoI AccII Esp1396I Bsp1286I MwoI BstUI
atgCGTgaaatCGtgagTcctcaccgcccctgatgcccaccaccCGTggggcagCGTttatCGcgacaacaaa base
pairs
tacgcaCTttagcaCTcaggagTggcggggactacggTggtggcgcaCCCGTgCGcaaatagCGctgttGttt 1 to 75
PleI HphI SfaNI ThaI AciI DraIII MluI MvnI ThaI
BstUI BslI AccB7I AccII Bsp68I
Bsh1236I Van91I BmyI BstUI NruI

Fsp4HI Alw26I MspI CfrI BsuRI AfaI Ecol
MvnI TthHB8I Bse118I CviJI BseI MaeII
AciI TspRI HinfI BsmAI BsrFI BsiSI Pali TspRI BstSNI
tggCGcgggcagTgtgCTaacagagTctCGacgacaggttcatctccaaaccggccagTgtgtacgTaaacgCGc base
pairs
accCGccCGTcacacgattgtctcagagTgtgtccaagtagagTttggccggtcacacatgcatttgCGcg 76 to
150
ItaI PleI BssAI HpaII BsrI Csp6I SnaBI
Bsh1236I TaqI Cfr10I EaeI BseNI RsaI AccII
BsoFI HapII HaeIII BsrSI BsaAI

05I MvnI TthHB8I BcoI BseDI BbvI
HinPI CfoI HinfI PleI BssT1I BsoFI MvaI269I
Hin6I TaqI BsoBI Sse9I Eco130I ItaI BsaMI
tgtatCGacacgactCGggcaggaattgacatCGccaagggaatcaaataggtgctgcattctggcagaccatc base
pairs
acatagctgtgctgagccCGTccttaactgtagCGgttccCGttagTttatccacgacgTaaagaccGTctggtag 151 to
225
ThaI AspLEI Ama87I TspEI StyI EcoT14I Fsp4HI BsmI
```

BstUI HhaI AvaI Tsp509I ErhI Bst71I  
 HspAI Bsh1236I Eco88I BsaJI

CviJI TaqI BbvI  
 BsiSI Hsp92II CviJI BsoFI  
 MspI MwoI Pali BglI BsgI BsrDI ItaI AlwNI

tccggcgaacatggcctcgacggctctggcgtgtatgtgcagaatatcgcaatggataagtggagcagcgactga base  
 pairs  
 aggccgcttgaccggagctgcccagaccgcacatacacgtcttatagcgttacctattcacctcgtcgctgact 226 to  
 300

HapII NlaIII TthHB8I Fsp4HI PshAI  
 HpaII HaeIII Bst71I  
 BsuRI MnlI

Msp17I RsaI BpmI Sfr274I Hin6I MaeII  
 HinlI AatII AfaI GsuI PaeR7I TaqI AspLEI AfaI  
 Hsp92I BsgI MaeII MnlI BsoBI BcoI HinP1I AccI Csp6I Cac8I

cgtcgtgcaggtacaatggcagctgacccagctcgagcgcgatgaacgtctacttcaacgaggtacgcccgc base  
 pairs  
 gcagcacgtccatggtaccgtgcagactggaggctcgagctcgctacttgagatgaagttgctccatgccccgc 301 to  
 375

BbiIII Csp6I AluI XhoI TthHB8I HhaI MnlI  
 MaeII BspMI CviJI Ama87I HspAI Hsp92II RsaI  
 AcyI BsaHI AvaI Eco88I CfoI NlaIII

BmyI Sfr274I CviJI HgaI BsiSI  
 FauI Bsp1286I XhoI BcoI AccII MspI  
 SduI AspHI AvaI Eco88I Thai CviJI MaeIII BsmFI

attgagcagagcaccaaaactgctcaactcgagctgacgcgaactccacaggcttccggtacaagaatgtgccac base  
 pairs  
 taactcgtctcgtggttgacgagttgagctcgactgcgcttgaggtgtccgaaggccattgttcatacaggggtg 376 to  
 450

AciI Alw21I BsoBI TthHB8I Bsh1236I BsaWI MaeII  
 Bbv12I PaeR7I TaqI BstUI HapII  
 BsiHKAI Ama87I AluI MvnI HpaII

Eco72I ScrFI BanI Bsp19I BseDI Hsp92II HspAI AciI Eco47I  
 PmaCI TaqI EcoRII BstOI NlaIV BssT1I NlaIII MwoI Hin6I HhaI SinI  
 BbrPI MnlI NlaIV BstNI AccB1I NcoI BsaJI FokI HinP1I CfoI Sau96I

gtgccgtcctcgtcgatttgaggcctggcaccatggatgccgtccgcgctgggtcctctcggccagcttttccgcc base  
 pairs  
 cacggcaggagcagctaaacctcggaccgtggtacactcggcaggcgcgaccaggaragccgggtcgaaggccgg 451 to  
 525

TthHB8I PspN4I MspR9I BshNI StyI BstDSI SfaNI BstUI AspLEI Cfr13I  
 BsaAI CviJI Bst2UI PspN4I ErhI EcoT14I AccII MvnI Bmel8I AspS9I  
 PmlI MvaI Eco64I Eco130I DsaI BstF5I Thai Bsh1236I AsuI

AvaII CviJI AciI EaeI HaeIII HapII BanI HinP1I Hsp92I HhaI BbeI Sau96I BsrSI  
 CfrI Cac8I Bbv16II BsrI MwoI Eco64I HspAI BsaHI AspLEI BsiSI AspS9I BsuRI  
 HgiEI Pali CviJI BbsI CviJI BsrSI KasI BshNI AcyI NlaIV MspI Bsp143II BselI

cagacaacttcgtcttcggccagtcggcgccggaacaactggccaagggctcactatactgaagtgccgagc base  
 pairs  
 gtctgttgaagcagaagccggctcaggccggcctttgttgaccgggttcccagtgatgatgacttccacggctcg 526 to  
 600

EaeI AluI MboII BsuRI MspI BsiSI HinlI Hin6I PspN4I HaeII Cfr13I HaeIII  
 HaeIII CfrI BpiI BseNI BglI AccB1I NarI EheI BstH2I HpaII BsrI CviJI

MnlI BsuRI DrdI BpuAI Pali BselI HpaII Msp17I BbiII CfoI HapII AsuI BseNI

StyI EcoT14I AccB1I SduI Bsp1286I Sali AccI MvaI TthHB8I ThaI BslI Pali ItaI  
 BseDI BanI BshNI AluI Eco24I BsiHKAI HincII Bst2UI AciI BstUI HaeIII CviJI  
 Eco130I Tsp45I PspN4I Alw21I SacI AspHI HindII MspR9I Fsp4HI MvnI CviJI MnlI  
 tcgctgaccagggttctcgatgctgctccgccgagggcggagggctgcgactgcctccaaggtttccagatcaccc base  
 pairs  
 agcagctggtccaagagctacagcaggcgggcgtccggctcccagcgtgacggaggttccaaggtctagtggg 601 to  
 675

BssT1I Eco64I EcoICRI BanII BmyI TthHB8I EcoRII TaqI BsoFI Bsh1236I BsaJI  
 ErhI MaeIII NlaIV CviJI Bbv12I SstI TaqI ScrFI BstOI AccII BsiYI BsuRI  
 Pali BsaJI Eco57I Ecl136II FriOI Psp124BI SexAI BstNI ItaI Bsc4I MnlI BseDI

MwoI ErhI MboI DpnI MnlI BanI BselI Bsel18I Eco64I NlaIV MboI DpnII BseRI  
 Eco130I Kzo9I DpnII Csp6I BsrI BsrSI Cfr10I BanI Csp6I BstX2I MflI MnlI  
 BbvI BssT1I Bsp143I BsaJI AccB1I BsrFI HapII Asp718I PspN4I Sau3AI AclWI  
 actccctcgggtggtggtactggtgcccgtatgggtacccttctcatcagcaagatccgtgaggagttcccagacc base  
 pairs  
 tgaggagaccaccaccatgaccacggccatacccatgggaagagtagtgcgttctaggcactcctcaagggctctgg 676 to  
 750

Bst71I BseDI Sau3AI BseDI RsaI BseNI BssAI HpaII BshNI KpnI XhoII BstYI  
 Fsp4HI MnlI BsaJI NdeII XcmI Eco64I NlaIV MspI Acc65I AfaI Kzo9I NdeII AlwI  
 BsoFI StyI EcoT14I HphI AfaI BshNI PspN4I BsiSI AccB1I RsaI Bsp143I DpnI

BsiYI MscI Pali  
 NlaIII CviJI  
 AciI CfrI HaeIII NlaIII AspI  
 AtsI CviJI  
 atgatggccacattctccgctcatgccatctccaaaggtgtccgacaccgctcgttgagccatacaacgcccactc base pairs  
 tactaccggtgtaagaggcagtagcgttagaggtttccacaggctgtggcagcaactcggatggtgcccgtgag 751 to 825

Bsc4I EaeI Bali Hsp92II Tth111I  
 Hsp92II BsuRI  
 BslI MluNI

CfoI Csp6I  
 HspAI BstH2I  
 CviJI BsaI HspAI BstH2I  
 HphI TthHB8I BsmAI TthHB8I HinP1I Bsp143II  
 tccggtcaccagctcgtcgagaactccgacgagacettctgtatcgacaacgagggcgtgtacgacatttgca base pairs  
 aggcaagtggctcgagcagctcttgaggctgctctggaagacatagctgtgctccgacatgctgtaaacgt 826 to 900

AluI TaqI Alw26I TaqI MnlI HhaI RsaI MslI  
 Eco31I Hin6I HaeII  
 AspLEI AfaI

PaeI NspI AspLEI AciI HapII  
 HinP1I Acc16I AluI BslI BsmBI BsaWI MaeIII  
 Cac8I HspAI AviII Bsc4I MnlI Esp3I NlaIII HpaII  
 tgcgactctgaagctcaacaaccatcttacggcgacttgaaccacctcgtctccgcccgtcatgtccgggtgga base  
 pairs  
 acgctgagacttcgagttggtgggtagaatgccgctgaacttggtggagcagaggcggcagtagccacact 901 to  
 975

NlaIII Hin6I HhaI BsiYI BsmAI Hsp92II  
 SphI BbuI CfoI CviJI Alw26I MspI Tsp45I  
 Hsp92II FspI Eco57I BsiSI

MvaI CviJI NdeII HinP1I HhaI AccB1I  
 AhdI BsaJI Bst2UI Bsp143I Acc16I HindIII Eco64I  
 AspEI EcoRII BstOI Kzo9I MwoI AviII AluI NlaIII MaeII



caacctgtctgctgttccaggtcagctcaacagcgatctgcgcaagcttgccgtgaacatgggtgccgttccac base  
pairs  
gttggacagacgcaaaggggtccagtcgagttgtcgctagacgcggttcgaacggcacttgtaccacggcaaggggtg 976 to  
1050  
EclHKI BseDI MspR9I MboI DpnI FspI Cac8I Hsp92II  
Eam1105I ScrFI AluI Sau3AI Hin6I AspLEI BanI NlaIV  
BstNI DpnII HspAI CfoI CviJI BshNI PspN4I

BsmBI Hsp92II DsaI Hin6I HphI  
Esp3I MboII CviJI HspAI MaeIII  
gtctccacttcttcatggttggttgcaccactcactagccgtggcgcacactccttccgtgctgtcaccggttc base  
pairs  
cagaggtgaagaagtaccaaccaaagcgtggtgagtgatcgccaccgctgtgaggaaggcagcagctggcaag 1051 to  
1125  
BsmAI NlaIII MaeI HinPII Tsp45I  
Alw26I BseDI CfoI  
BsaJI AspLEI

SduI Bsp1286I MwoI MboII HaeIII AciI EaeI CviJI Bsh1285I  
AluI BanII BmyI HphI TaqI Hsp92II Fsp4HI EagI HaeIII MaeIII  
EcoICRI FriOI BsiHKAI XcmI CfrI BsuRI MwoI CfrI Eco52I BstMCI  
cagagctcaccagcaaatcttcgaccccaagaacatgatggccgagcagacttccgcaacggccgttacctca base  
pairs  
gtctcgagtggtcgctttagaagctgggttcttgtactaccggcgctgctgaaggcgttgccggcaatggagt 1126 to  
1200  
Ecl136II Bbv12I AspHI NlaIII PalI Cac8I AciI XmaIII BsiEI  
CviJI Eco24I Psp124BI EaeI ItaI BstZI BsuRI MnlI  
Alw21I SacI SstI TthHB8I CviJI BsoFI EclXI PalI BsaOI

NlaIII SinI AvaII MboI MflI MaeII  
BsaJI BslI Alw26I Sau96I Kzo9I NdeII DpnI BsgI  
CviJI BseDI BsiYI BsaI Bme18I HgiEI Sau3AI AclWI  
cttgctcggtatctaccgtggcaaggtctccatgaaggaagttgaggaccagatccgcaacgtgcagaacaaga base  
pairs  
gaacgagccgatagatggcaccggtccagaggtacttcttcaactcctggcttaggcgttgacgtcttgttct 1201 to  
1275  
DsaI Bsc4I BsmAI Eco47I MnlI Bsp143I AlwI  
BstDSI Eco31I AsuI AspS9I XhoII BstYI  
Hsp92II Cfr13I BstX2I DpnII AciI

Bbv12I ThaI Fsp4HI  
Alw21I BslI Bsh1236I  
TspRI TthHB8I MaeII AciI SduI AspHI Bsc4I MvnI  
acactgcctacttctgctcgagtgattccaaacaacgtccagaccgactgtgctctatcccaccacgcggcctca base  
pairs  
tgtgacggatgaagcagctcacctaaggttgggtgaggtctggcgtgacacgagataggggtggtgcgccggagt 1276 to  
1350  
TaqI TfiI TspRI BsiHKAI BsiYI ItaI  
Bsp1286I AccII BsoFI  
BmyI BstUI AciI

MnlI BpiI Bsp143I AclWI BstOI CviJI Bbv12I MboII SapI  
BpuAI Kzo9I DpnI AlwI Ecl136II Bsp1286I Eam1104I  
HaeIII MboII TthHB8I EcoRII Bst2UI Alw21I SacI SstI MwoI  
agatgtcttctaccttctggttggaaacagcacttcgatccaggagctcttcaagcgtgctgggtgaccagttcactg base

pairs  
tctacagaagatggaagcaacctttgtcgtgaagctaggctcctcgagaagttcgcacagccactgggtcaagtgc 1351 to  
1425  
CviJI Bbv16II TaqI NdeII MvaI EcoICRI Eco24I Psp124BI Ksp632I  
PalI BbsI MboI DpnII BstNI AluI BanII BmyI AspHI EarI  
BsuRI Sau3AI ScrFI MspR9I SduI FriOI BsiHKAI PspEI

BstEII BseII Bsc4I Hin6I Pme55I TspRI AfaI BsrSI DdeI  
EcoO65I BseNI Hsp92II HhaI HaeIII Csp6I TspRI TspRI  
MaeIII HphI MslI BslI AspLEI CviJI BsrI RsaI MnlI DdeI MnlI  
ccatggtcaggcgcaaggccttcttgactgggtacactggcgagggtatggacgagatggagttcactgaggctg base  
pairs  
gggtacaagtccgcgttccggaagaacgtgaccatgtgaccgctccatacctgctctacctcaagtgactccgcac 1426 to  
1500  
Tsp45I TspRI HinP1I AatI BsuRI BseNI BsrI BstDEI  
BstPI BsrI NlaIII HspAI StuI Ecol47I BsrSI BseII CviJI  
Eco91I BsrSI BsiYI CfoI SseBI PalI BseII BseNI BstDEI

ScrFI AatI CviJI BsmAI  
AhdI RsaI RsaI Bst2UI SseBI PalI BsaJI  
PleI NlaIII AspEI Csp6I Csp6I BstNI MnlI Ecol47I MnlI MnlI Csp6I  
agtccaacatgaacgacttggtgtccgagtaccagcagtaccaggaggcctctgtctccgagggagaggaggagt base  
pairs  
tcaggttgtacttgtgaaccacaggctcatggctgctcatggctcctccggagacagaggctccctctcctcctca 1501 to  
1575  
HinfI Hsp92II EclHKI AfaI AfaI MspR9I Pme55I MnlI BseRI  
Eam1105I EcoRII BstOI HaeIII BseDI  
MvaI StuI BsuRI Alw26I

BanI HinP1I Hsp92I BstH2I MnlI  
AfaI KasI Hin1I Hin6I PspN4I Bsc4I  
MnlI BshNI AcyI NlaIV HaeII BslI  
acgacgaggaggcgccacttgaaggcgaggagtag base pairs  
tgctgctcctccgcggtgaacttccgctcctcatc 1576 to 1610  
BseRI Msp17I BsaHI HhaI Bsp143II  
RsaI Eco64I HspAI EheI CfoI BbeI BseRI  
AccB1I NarI BbiII AspLEI BsiYI

---

**Table by Enzyme Name**

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence	<a href="#">More info</a>
AatI	2	1443 1548	agg/cct	<a href="#">More info</a>
AatII	1	303	gacgt/c	<a href="#">More info</a>
Acc16I	2	903 1017	tgc/gca	<a href="#">More info</a>
Acc65I	1	708	g/gtacc	<a href="#">More info</a>
AccB1I	7	477 552 591 696 708 1037 1586	g/gyrcc	<a href="#">More info</a>
AccB7I	1	46	ccannnn/ntgg	<a href="#">More info</a>
AccI	2	352 604	gt/mkac	<a href="#">More info</a>
AccII	8	45 56 65 147 413 496 631 1342	cg/cg	<a href="#">More info</a>
Acii	14	27 46 81 375 497 524 629 752 958 1171 1184 1259 1321 1345	ccgc	<a href="#">More info</a>
AclWI	3	732 1257 1389	ggatc	<a href="#">More info</a>
AcyI	3	300 553 1587	gr/cgyc	<a href="#">More info</a>

AfaI	10	138 312 367 692 710 888 1458 1530 1539 1575	gt/ac	<a href="#">More info</a>
AflIII	1	54	a/crygt	<a href="#">More info</a>
AhdI	2	979 1520	gacnnn/nngtc	<a href="#">More info</a>
AluI	10	335 407 515 599 839 914 1001 1022 1130 1394	ag/ct	<a href="#">More info</a>
Alw21I	5	388 601 1132 1329 1396	gwgw/c	<a href="#">More info</a>
Alw26I	6	104 862 955 1055 1231 1558	gtctc	<a href="#">More info</a>
AlwI	3	732 1257 1389	ggatc	<a href="#">More info</a>
AlwNI	1	296	cagnnn/ctg	<a href="#">More info</a>
Ama87I	3	164 336 402	c/ycgrg	<a href="#">More info</a>
Asp718I	1	708	g/gtacc	<a href="#">More info</a>
AspEI	2	979 1520	gacnnn/nngtc	<a href="#">More info</a>
AspHI	5	388 601 1132 1329 1396	gwgw/c	<a href="#">More info</a>
AspI	1	798	gacn/nngtc	<a href="#">More info</a>
AspLEI	10	149 343 498 555 884 904 1018 1098 1438 1589	gcg/c	<a href="#">More info</a>
AspS9I	3	501 568 1247	g/gncc	<a href="#">More info</a>
AsuI	3	501 568 1247	g/gncc	<a href="#">More info</a>
AtsI	1	798	gacn/nngtc	<a href="#">More info</a>
AvaI	3	164 336 402	c/ycgrg	<a href="#">More info</a>
AvaII	2	501 1247	g/gwcc	<a href="#">More info</a>
AviII	2	903 1017	tgc/gca	<a href="#">More info</a>
Bali	1	759	tgg/cca	<a href="#">More info</a>
BanI	7	477 552 591 696 708 1037 1586	g/gyrcc	<a href="#">More info</a>
BanII	3	601 1132 1396	grgcy/c	<a href="#">More info</a>
BbeI	2	556 1590	ggcgc/c	<a href="#">More info</a>
BbiII	3	300 553 1587	gr/cgyc	<a href="#">More info</a>
BbrPI	1	450	cac/gtg	<a href="#">More info</a>
BbsI	2	542 1360	gaagac	<a href="#">More info</a>
BbuI	1	902	gcatg/c	<a href="#">More info</a>
Bbv12I	5	388 601 1132 1329 1396	gwgw/c	<a href="#">More info</a>
Bbv16II	2	542 1360	gaagac	<a href="#">More info</a>
BbvI	3	209 294 647	gcagc	<a href="#">More info</a>
BcoI	3	164 336 402	c/ycgrg	<a href="#">More info</a>
BfaI	1	1087	c/tag	<a href="#">More info</a>
BglI	2	245 550	gccnnnn/nggc	<a href="#">More info</a>
Bme18I	2	501 1247	g/gwcc	<a href="#">More info</a>
BmyI	6	54 388 601 1132 1329 1396	gdgch/c	<a href="#">More info</a>
BpiI	2	542 1360	gaagac	<a href="#">More info</a>
BpmI	1	335	ctggag	<a href="#">More info</a>
BpuAI	2	542 1360	gaagac	<a href="#">More info</a>
BsaAI	2	140 450	yac/gtr	<a href="#">More info</a>
BsaHI	3	300 553 1587	gr/cgyc	<a href="#">More info</a>
BsaI	2	863 1231	ggtctc	<a href="#">More info</a>
BsaJI	10	185 481 571 637 656 680 992 1091 1217 1558	c/cnngg	<a href="#">More info</a>
BsaMI	1	213	gaatgc	<a href="#">More info</a>
BsaOI	1	1190	cgry/cg	<a href="#">More info</a>
BsaWI	2	429 966	w/ccggw	<a href="#">More info</a>
Bsc4I	8	45 631 754 929 1222 1340 1431 1595	ccnnnn/nnngg	<a href="#">More info</a>
Bse118I	2	125 699	r/ccggy	<a href="#">More info</a>
Bse1I	7	134 549 569 697 1419 1457 1465	actgg	<a href="#">More info</a>
BseDI	10	185 481 571 637 656 680 992 1091 1217 1558	c/cnngg	<a href="#">More info</a>

BseNI	7	134 549 569 697 1419 1457 1465	actgg	<a href="#">More info</a>
BseRI	4	740 1571 1586 1607	gaggag	<a href="#">More info</a>
BsgI	3	267 310 1268	gtgcag	<a href="#">More info</a>
<b>Bsh1236I</b>	<b>8</b>	<b>45 56 65 147 413 496 631 1342</b>	<b>cg/cg</b>	<a href="#">More info</a>
Bsh1285I	1	1190	cgry/cg	<a href="#">More info</a>
BshNI	7	477 552 591 696 708 1037 1586	g/gyrcc	<a href="#">More info</a>
BsiEI	1	1190	cgry/cg	<a href="#">More info</a>
BsiHKAI	5	388 601 1132 1329 1396	gwgcw/c	<a href="#">More info</a>
BsiSI	7	126 227 430 550 556 700 967	c/cgg	<a href="#">More info</a>
BsiYI	8	46 632 755 930 1223 1341 1432 1596	ccnnnnn/nngg	<a href="#">More info</a>
BslI	8	46 632 755 930 1223 1341 1432 1596	ccnnnnn/nngg	<a href="#">More info</a>
BsmAI	6	104 862 955 1055 1231 1558	gtctc	<a href="#">More info</a>
BsmBI	2	955 1055	cgtctc	<a href="#">More info</a>
BsmFI	1	448	gggac	<a href="#">More info</a>
BsmI	1	213	gaatgc	<a href="#">More info</a>
BsoBI	3	164 336 402	c/ycgrg	<a href="#">More info</a>
BsoFI	7	79 206 291 629 644 1168 1343	gc/ngc	<a href="#">More info</a>
Bsp1286I	6	54 388 601 1132 1329 1396	gdgch/c	<a href="#">More info</a>
Bsp143I	5	667 727 1010 1252 1384	/gatc	<a href="#">More info</a>
Bsp143II	3	556 885 1590	rgcgc/y	<a href="#">More info</a>
Bsp19I	1	481	c/catgg	<a href="#">More info</a>
Bsp68I	1	65	tcg/cga	<a href="#">More info</a>
BspMI	1	312	acctgc	<a href="#">More info</a>
BsrDI	1	279	gcaatg	<a href="#">More info</a>
BsrFI	2	125 699	r/ccggy	<a href="#">More info</a>
BsrI	7	134 549 569 697 1419 1457 1465	actgg	<a href="#">More info</a>
BsrSI	7	134 549 569 697 1419 1457 1465	actgg	<a href="#">More info</a>
BssAI	2	125 699	r/ccggy	<a href="#">More info</a>
BssT1I	4	185 481 571 656	c/cwgg	<a href="#">More info</a>
Bst2UI	5	475 609 994 1389 1542	cc/wgg	<a href="#">More info</a>
Bst71I	3	209 294 647	gcagc	<a href="#">More info</a>
BstDEI	2	1492 1498	c/tnag	<a href="#">More info</a>
BstDSI	3	481 1091 1217	c/crygg	<a href="#">More info</a>
BstEII	1	1410	g/gtnacc	<a href="#">More info</a>
BstF5I	1	489	ggatg	<a href="#">More info</a>
BstH2I	3	556 885 1590	rgcgc/y	<a href="#">More info</a>
BstMCI	1	1190	cgry/cg	<a href="#">More info</a>
BstNI	5	475 609 994 1389 1542	cc/wgg	<a href="#">More info</a>
BstOI	5	475 609 994 1389 1542	cc/wgg	<a href="#">More info</a>
BstPI	1	1410	g/gtnacc	<a href="#">More info</a>
BstSNI	1	140	tac/gta	<a href="#">More info</a>
BstUI	8	45 56 65 147 413 496 631 1342	cg/cg	<a href="#">More info</a>
BstX2I	2	727 1252	r/gatcy	<a href="#">More info</a>
BstYI	2	727 1252	r/gatcy	<a href="#">More info</a>
BstZI	1	1187	c/ggccg	<a href="#">More info</a>
BsuRI	12	129 239 511 544 570 636 759 1167 1189 1345 1443 1548	gg/cc	<a href="#">More info</a>
Cac8I	6	54 372 513 900 1020 1172	gcn/ngc	<a href="#">More info</a>
CfoI	10	149 343 498 555 884 904 1018 1098 1438 1589	gcg/c	<a href="#">More info</a>
Cfr10I	2	125 699	r/ccggy	<a href="#">More info</a>
Cfr13I	3	501 568 1247	g/gncc	<a href="#">More info</a>
CfrI	6	127 509 542 757 1165 1187	y/ggccc	<a href="#">More info</a>
Csp6I	10	137 311 366 691 709 887 1457	g/tac	<a href="#">More info</a>

CviJI	30	1529 1538 1574 129 239 248 335 407 426 473 511 515 544 570 599 636 643 759 809 839 914 1001 1022 1090 1130 1167 1189 1209 1345 1394 1443 1497 1548	rg/cy	<a href="#">More info</a>
DdeI	2	1492 1498	c/tnag	<a href="#">More info</a>
DpnI	5	669 729 1012 1254 1386	ga/tc	<a href="#">More info</a>
DpnII	5	667 727 1010 1252 1384	/gatc	<a href="#">More info</a>
DraIII	1	46	cacnnn/gtg	<a href="#">More info</a>
DrdI	1	534	gacnnnn/nngtc	<a href="#">More info</a>
DsaI	3	481 1091 1217	c/crygg	<a href="#">More info</a>
EaeI	6	127 509 542 757 1165 1187	y/ggcsr	<a href="#">More info</a>
EagI	1	1187	c/ggccg	<a href="#">More info</a>
Eam1104I	1	1400	ctcttc	<a href="#">More info</a>
Eam1105I	2	979 1520	gacnnn/nngtc	<a href="#">More info</a>
EarI	1	1400	ctcttc	<a href="#">More info</a>
Ecl136II	3	599 1130 1394	gag/ctc	<a href="#">More info</a>
EclHKI	2	979 1520	gacnnn/nngtc	<a href="#">More info</a>
EclXI	1	1187	c/ggccg	<a href="#">More info</a>
Eco105I	1	140	tac/gta	<a href="#">More info</a>
Eco130I	4	185 481 571 656	c/cwgg	<a href="#">More info</a>
Eco147I	2	1443 1548	agg/cct	<a href="#">More info</a>
Eco24I	3	601 1132 1396	grgcy/c	<a href="#">More info</a>
Eco31I	2	863 1231	ggtctc	<a href="#">More info</a>
Eco47I	2	501 1247	g/gwcc	<a href="#">More info</a>
Eco52I	1	1187	c/ggccg	<a href="#">More info</a>
Eco57I	2	591 914	ctgaag	<a href="#">More info</a>
Eco64I	7	477 552 591 696 708 1037 1586	g/gyrcc	<a href="#">More info</a>
Eco72I	1	450	cac/gtg	<a href="#">More info</a>
Eco88I	3	164 336 402	c/ycgrg	<a href="#">More info</a>
Eco91I	1	1410	g/gtnacc	<a href="#">More info</a>
EcoICRI	3	599 1130 1394	gag/ctc	<a href="#">More info</a>
EcoO65I	1	1410	g/gtnacc	<a href="#">More info</a>
EcoRII	5	473 607 992 1387 1540	/ccwgg	<a href="#">More info</a>
EcoT14I	4	185 481 571 656	c/cwgg	<a href="#">More info</a>
EheI	2	554 1588	ggc/gcc	<a href="#">More info</a>
ErhI	4	185 481 571 656	c/cwgg	<a href="#">More info</a>
Esp1396I	1	46	ccannnn/ntgg	<a href="#">More info</a>
Esp3I	2	955 1055	cgtctc	<a href="#">More info</a>
FauI	1	375	cccgc	<a href="#">More info</a>
FokI	1	489	ggatg	<a href="#">More info</a>
FriOI	3	601 1132 1396	grgcy/c	<a href="#">More info</a>
Fsp4HI	7	79 206 291 629 644 1168 1343	gc/ngc	<a href="#">More info</a>
FspI	2	903 1017	tgc/gca	<a href="#">More info</a>
GsuI	1	335	ctggag	<a href="#">More info</a>
HaeII	3	556 885 1590	rgcgc/y	<a href="#">More info</a>
HaeIII	12	129 239 511 544 570 636 759 1167 1189 1345 1443 1548	gg/cc	<a href="#">More info</a>
HapII	7	126 227 430 550 556 700 967	c/cgg	<a href="#">More info</a>
HgaI	1	414	gacgc	<a href="#">More info</a>
HgiEI	2	501 1247	g/gwcc	<a href="#">More info</a>
HhaI	10	149 343 498 555 884 904 1018 1098 1438 1589	gcg/c	<a href="#">More info</a>
Hin1I	3	300 553 1587	gr/cgyc	<a href="#">More info</a>
Hin6I	10	147 341 496 553 882 902 1016	g/cgc	<a href="#">More info</a>

		1096 1436 1587		
HinPII	10	147 341 496 553 882 902 1016	g/cgc	<a href="#">More info</a>
		1096 1436 1587		
HincII	1	605	gty/rac	<a href="#">More info</a>
HindIII	1	605	gty/rac	<a href="#">More info</a>
HindIII	1	1020	a/agctt	<a href="#">More info</a>
HinfI	5	15 98 162 1298 1500	g/antc	<a href="#">More info</a>
HpaII	7	126 227 430 550 556 700 967	c/cgg	<a href="#">More info</a>
HphI	6	25 674 837 1121 1136 1414	ggtga	<a href="#">More info</a>
Hsp92I	3	300 553 1587	gr/cgyc	<a href="#">More info</a>
Hsp92II	13	238 347 485 755 776 902 965 1037	catg/	<a href="#">More info</a>
		1067 1163 1235 1430 1511		
HspAI	10	147 341 496 553 882 902 1016	g/cgc	<a href="#">More info</a>
		1096 1436 1587		
ItaI	7	79 206 291 629 644 1168 1343	gc/ngc	<a href="#">More info</a>
KasI	2	552 1586	g/gcgcc	<a href="#">More info</a>
KpnI	1	712	ggtac/c	<a href="#">More info</a>
Ksp632I	1	1400	ctcttc	<a href="#">More info</a>
Kzo9I	5	667 727 1010 1252 1384	/gatc	<a href="#">More info</a>
MaeI	1	1087	c/tag	<a href="#">More info</a>
MaeII	8	139 300 321 349 449 1049 1261	a/cgt	<a href="#">More info</a>
		1309		
MaeIII	6	432 576 971 1115 1191 1410	/gtnac	<a href="#">More info</a>
MboI	5	667 727 1010 1252 1384	/gatc	<a href="#">More info</a>
MboII	5	542 1064 1148 1360 1400	gaaga	<a href="#">More info</a>
MflI	2	727 1252	r/gatcy	<a href="#">More info</a>
MluI	1	54	a/cgcgt	<a href="#">More info</a>
MluNI	1	759	tgg/cca	<a href="#">More info</a>
MnlI	24	22 243 332 366 461 507 636 642	cctc	<a href="#">More info</a>
		656 683 738 882 950 1199 1248		
		1349 1470 1497 1548 1552 1563		
		1569 1584 1605		
MscI	1	759	tgg/cca	<a href="#">More info</a>
MslI	2	897 1425	caynn/nnrtg	<a href="#">More info</a>
Msp17I	3	300 553 1587	gr/cgyc	<a href="#">More info</a>
MspI	7	126 227 430 550 556 700 967	c/cgg	<a href="#">More info</a>
MspR9I	5	475 609 994 1389 1542	cc/ngg	<a href="#">More info</a>
Mva1269I	1	213	gaatgc	<a href="#">More info</a>
MvaI	5	475 609 994 1389 1542	cc/wgg	<a href="#">More info</a>
MvnI	8	45 56 65 147 413 496 631 1342	cg/cg	<a href="#">More info</a>
MwoI	10	32 62 236 495 550 649 1015 1136	gcnnnnn/nngc	<a href="#">More info</a>
		1180 1400		
NarI	2	553 1587	gg/cgcc	<a href="#">More info</a>
NcoI	1	481	c/catgg	<a href="#">More info</a>
NdeII	5	667 727 1010 1252 1384	/gatc	<a href="#">More info</a>
NlaIII	13	238 347 485 755 776 902 965 1037	catg/	<a href="#">More info</a>
		1067 1163 1235 1430 1511		
NlaIV	8	472 479 554 593 698 710 1039	ggn/ncc	<a href="#">More info</a>
		1588		
NruI	1	65	tcg/cga	<a href="#">More info</a>
NspI	1	902	rcatg/y	<a href="#">More info</a>
PaeI	1	902	gcatg/c	<a href="#">More info</a>
PaeR7I	2	336 402	c/tcgag	<a href="#">More info</a>
PalI	12	129 239 511 544 570 636 759 1167	gg/cc	<a href="#">More info</a>
		1189 1345 1443 1548		
PflMI	1	46	ccannnn/ntgg	<a href="#">More info</a>

PleI	4	19 102 166 1504	gagtc	<a href="#">More info</a>
PmaCI	1	450	cac/gtg	<a href="#">More info</a>
Pme55I	2	1443 1548	agg/cct	<a href="#">More info</a>
PmlI	1	450	cac/gtg	<a href="#">More info</a>
PshAI	1	299	gacnn/nngtc	<a href="#">More info</a>
Psp124BI	3	601 1132 1396	gagct/c	<a href="#">More info</a>
PspEI	1	1410	g/gtnacc	<a href="#">More info</a>
PspN4I	8	472 479 554 593 698 710 1039 1588	ggn/ncc	<a href="#">More info</a>
RsaI	10	138 312 367 692 710 888 1458 1530 1539 1575	gt/ac	<a href="#">More info</a>
SacI	3	601 1132 1396	gagct/c	<a href="#">More info</a>
SalI	1	603	g/tcgac	<a href="#">More info</a>
SapI	1	1400	gctcttc	<a href="#">More info</a>
Sau3AI	5	667 727 1010 1252 1384	/gatc	<a href="#">More info</a>
Sau96I	3	501 568 1247	g/gncc	<a href="#">More info</a>
ScrFI	5	475 609 994 1389 1542	cc/ngg	<a href="#">More info</a>
SduI	6	54 388 601 1132 1329 1396	gdgch/c	<a href="#">More info</a>
SexAI	1	607	a/ccwgg	<a href="#">More info</a>
SfaNI	2	36 490	gcatc	<a href="#">More info</a>
Sfr274I	2	336 402	c/tcgag	<a href="#">More info</a>
SinI	2	501 1247	g/gwcc	<a href="#">More info</a>
SnaBI	1	140	tac/gta	<a href="#">More info</a>
SphI	1	902	gcatg/c	<a href="#">More info</a>
Sse9I	1	173	/aatt	<a href="#">More info</a>
SseBI	2	1443 1548	agg/cct	<a href="#">More info</a>
SstI	3	601 1132 1396	gagct/c	<a href="#">More info</a>
StuI	2	1443 1548	agg/cct	<a href="#">More info</a>
StyI	4	185 481 571 656	c/cwgg	<a href="#">More info</a>
TaqI	13	103 155 242 337 403 463 604 616 844 871 1147 1291 1383	t/cga	<a href="#">More info</a>
TfiI	1	1298	g/awtc	<a href="#">More info</a>
ThaI	8	45 56 65 147 413 496 631 1342	cg/cg	<a href="#">More info</a>
Tsp45I	4	576 971 1115 1410	/gtsac	<a href="#">More info</a>
Tsp509I	1	173	/aatt	<a href="#">More info</a>
TspEI	1	173	/aatt	<a href="#">More info</a>
TspRI	8	89 135 1281 1325 1425 1456 1464 1494	cagtg	<a href="#">More info</a>
Tth111I	1	798	gacn/nngtc	<a href="#">More info</a>
TthHB8I	13	103 155 242 337 403 463 604 616 844 871 1147 1291 1383	t/cga	<a href="#">More info</a>
Van91I	1	46	ccannnn/ntgg	<a href="#">More info</a>
XcmI	2	681 1160	ccannnn/nnntgg	<a href="#">More info</a>
XhoI	2	336 402	c/tcgag	<a href="#">More info</a>
XhoII	2	727 1252	r/gatcy	<a href="#">More info</a>
XmaIII	1	1187	c/ggccg	<a href="#">More info</a>

---

The following endonucleases were selected but don't cut this sequence:

Acc113I, AccBSI, AccIII, AclNI, AcsI, AfeI, AflII, AgeI, Alw44I, AocI, Aor51HI, ApaI, ApaLI, ApoI, AscI, AseI, AsnI, Asp700I, AvrII, BamHI, BanIII, BcgI, BclI, BcnI, BfrI, BglII, BlnI, BlpI, Bpull02I, Bpul4I, Bsa29I, BsaBI, BscI, Bse21I, Bse8I, BseAI, BseCI, BsePI, Bsh1365I, BsiI, BsiMI, BsiWI, Bspl06I, Bspl19I, Bspl20I, Bspl3I, Bspl407I, Bspl720I, BspCI, BspDI, BspEI, BspHI, BspLU11I, BspTI, BspXI, BsrBI, BsrBRI, BsrGI, BssHII, BssSI, Bst1107I, Bst98I, BstBI, BstD102I, BstI, BstSFI, BstXI, Bsu15I, Bsu36I, CciNI, CelII,

Cfr42I, Cfr9I, ClaI, CpoI, Csp45I, CspI, CvnI, DraI, DraII, Eco255I, Eco32I, Eco47III, Eco81I, EcoNI, EcoO109I, EcoRI, EcoRV, EcoT22I, FauNDI, FbaI, FseI, HpaI, Kpn2I, Ksp22I, KspI, LspI, MamI, MfeI, Mph1103I, MroI, MroNI, MseI, MspAII, MspCI, MunI, NaeI, NciI, NdeI, NgoAIV, NgoMI, NheI, NotI, NsiI, NspBII, NspV, PacI, Pfl23II, PinAI, Ple19I, PmeI, Ppu10I, PpuMI, PshBI, Psp1406I, Psp5II, PspAI, PspALI, PspLI, PspOMI, PstI, PstNHI, PvuI, PvuII, RcaI, RsrII, SacII, SbfI, ScaI, SfcI, SfiI, Sfr303I, SfuI, SgfI, SgrAI, SmaI, SmiI, SpeI, SplI, SrfI, Sse8387I, SspBI, SspI, SstII, SunI, SwaI, TruI, Tru9I, Vha464I, VneI, VspI, XbaI, XmaI, XmnI, Zsp2I



## Prilog 2.

### Restrikciona mapa gena za $\beta$ -tubulin rezistentnog izolata *C. beticola*

GenBank:  $\beta$ -tubulin gen, izolat AD-762 (AY856374)

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=61678004#sequence\\_616](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=61678004#sequence_616)

[78004](#)

[Graphic map](#) | [Table by enzyme name](#)

```
MvnI BslI AciI Cac8I MvnI Bsp68I
AccII DraIII BmyI MluI Bsh1236I
Bsc4I PflMI Van91I AccII AccII
HinfI MnlI AciI MwoI
atgCGTgaaatCGtgagTcctcaccgcccctgATGCCaccaccgCGTggggcAcgCGTttatCGcgacaacaaa base
pairs
tacgcacttttagcactcaggagTggcggggactacgggtggTggcgaccccCGTgcgcaaatagCGctgttGttt 1 to 75
PleI HphI SfaNI ThaI AccB7I SduI AflIII ThaI NruI
BstUI BsiYI Bsp1286I BstUI BstUI
Bsh1236I Esp1396I ThaI MwoI MvnI
AciI BsmAI BsiSI CfrI BseNI AfaI SnaBI
Fsp4HI TthHB8I Bse118I CviJI BseI Eco105I
Bsh1236I TspRI HinfI Alw26I BssAI MspI Pali TspRI BsaAI
tggcggcggcagTgtgctaacagagTctcgcagcagagTtcatctccaaaccggccagTgtgtacgtaaaccgCGc base
pairs
accgCCcgCGtcacacgattgtctcagagctgctgtccaagtagagTttggccggtcacacatgcatttgCGcg 76 to
150
BsoFI PleI BsrFI HapII BsuRI Csp6I HinPII
ItaI TaqI Cfr10I EaeI BsrSI RsaI BstSNI
HpaII HaeIII BsrI MaeII
Hin6I CfoI Ama87I Tsp509I BsaJI Bst71I
AccII AspLEI Eco88I Sse9I StyI ItaI BsaMI
ThaI HhaI HinfI BsoBI Eco130I BsoFI BsmI
tgtatCGacacgactCGggcaggaattgacatCGccaagggaatcaaataggtgctgcattctggcagaccatc base
pairs
acatagctgtgctgagcccgtccttaactgtagcggTtcccgTtagTttatccacgacgtaagaccgtctggtag 151 to
225
MvnI TthHB8I PleI ErhI BseDI Fsp4HI Mva1269I
BstUI TaqI AvaI TspEI BssT1I BbvI
HspAI Bsh1236I BcoI EcoT14I
CviJI MnlI Bst71I
```

MspI Hsp92II BglI ItaI AlwNI  
 BsiSI MwoI BsuRI CviJI BsgI BsrDI BsoFI PshAI  
 tccggcgaacatggcctcgacggctctggcggtgtatgtgcagaatcgcaatggataagtggagcagcgactga base  
 pairs  
 aggccgcttgtagccggagctgcccagaccgcacatacacgtcttatagcgttacctattcacctcgtcgctgact 226 to  
 300  
 HpaII NlaIII TaqI Fsp4HI  
 HapII HaeIII BbvI  
 PalI TthHB8I

Hsp92I BspMI BpmI Eco88I HspAI Hsp92II  
 MaeII BsgI AluI XhoI TthHB8I NlaIII RsaI  
 BsaHI Csp6I MaeII MnlI Ama87I PaeR7I AspLEI Csp6I Cac8I  
 cgctcgtgcaggtacaatggcagctctgacctccagctcgagcgcgatgaactctacttcaacgaggtacgccccg base  
 pairs  
 gcagcacgtccatggtaccgtgcagactggaggctcgagctcgcgctacttgcagatgaagttgctccatgccccg 301 to  
 375  
 HinfI AcyI RsaI CviJI AvaI HinPII CfoI MnlI  
 MspI7I AfaI GsuI BcoI TaqI Hin6I AccI AfaI  
 BbiII AatII Sfr274I BsoBI HhaI MaeII

Bbv12I BcoI BsoBI ThaI MspI  
 Acii AspHI TaqI Ama87I TthHB8I HgaI BsiSI  
 SduI BsiHKAI Sfr274I CviJI Bsh1236I CviJI MaeIII BsmFI  
 attgagcagagcaccaaactgctcgaactcgagctgacgcgaactccacaggcttccggttaacaagtatgtccca base  
 pairs  
 taactcgtctcgtggtttgacgagcttgagctcgactgcgcttgaggtgctccgaagccattgttccatacagggt 376 to  
 450  
 FauI Bsp1286I TthHB8I AvaI AluI MvnI BsaWI  
 BmyI XhoI PaeR7I AccII HpaII  
 Alw21I Eco88I TaqI BstUI HapII

PmlI BstNI Eco64I ErhI EcoT14I BstF5I ThaI Acii SinI AvaII  
 Eco72I TaqI CviJI ScrFI AccB1I NcoI DsaI FokI HspAI Bsh1236I AsuI  
 BbrPI MnlI NlaIV MspR9I BshNI StyI BstDSI SfaNI Hin6I AspLEI HgiEI  
 cgtgccgtcctcgtcgatttggagcctggcaccatggatgccgctccgctggttctctcggccagcttttccgc base  
 pairs  
 gcacggcaggagcagctaaacctcggaccgtggtacctacggcaggcgcgaccaggaragccggctcgaagggcg 451 to  
 525  
 MaeII TthHB8I PspN4I Bst2UI PspN4I BsaJI NlaIII HinPII MvnI Cfr13I  
 BsaAI EcoRII MvaI NlaIV BssT1I Bsp19I MwoI BstUI CfoI Sau96I  
 PmaCI BstOI BanI Ecol30I BseDI Hsp92II AccII HhaI Bmel8I

HaeIII AluI Bbv16II BsrSI MspI KasI BbiII Hin6I AspLEI MspI AsuI BseII  
 MnlI PalI Acii EaeI MboII BseII MwoI AccB1I BsaHI EheI Bsp143II AspS9I CviJI  
 EaeI BsuRI BpuAI PalI BseNI BglI BshNI Hsp92I PspN4I BsiSI Cfr13I BsrI  
 ccagacaacttctgtctcggccagctccggcgccggaacaactgggccaagggctactatactgaaggtgccgag base  
 pairs  
 ggtctgttgaagcagaagccgggtcaggccgccccttggtagcccggttcccagtgatgatgacttccacggctc 526 to  
 600  
 Eco47I CviJI DrdI BpiI BsuRI BsiSI Eco64I HinPII AcyI CfoI HpaII Sau96I HaeIII  
 CfrI Cac8I CfrI HaeIII HpaII BanI MspI7I NarI HhaI HaeII HapII BsrSI  
 AspS9I CviJI BbsI CviJI BsrI HapII HinI HspAI NlaIV BstH2I BbeI BseNI

Ecol30I MaeIII PspN4I Bsp1286I BanII TthHB8I BstOI TaqI Bsc4I BslI MnlI CviJI  
 BssT1I Eco64I Ecl136II Bbv12I Alw21I HincII MspR9I BsoFI BstUI PalI BseDI

ErhI BseDI Eco57I CviJI BmyI **SacI** BsiHKAI SexAI ScrFI Fsp4HI Bsh1236I BsaJI  
ctcgtcgaccaggttctcgatgtcgtccgcccgcgagccgagggctgcgactgcctccaaggtttccagatcacc base  
pairs  
gagcagctgggtccaagagctacagcagggcgctccgggtcccgcgctgacggaggttccaaaggtctagtgg 601 to  
675

StyI Tsp45I AccB1I SduI Eco24I SstI TaqI BstNI MvaI AciI AccII CviJI MnlI  
Pali BsaJI Bani NlaIV EcoICRI Psp124BI AccI EcoRII TthHB8I Thai BsiYI BsuRI  
BsuRI EcoT14I BshNI AluI AspHI FriOI Sali HindII Bst2UI ItaI Mvni HaeIII BsoFI

MwoI BsaJI Sau3AI BseDI Eco64I BsrI Bsel18I Asp718I AfaI NdeII XhoII  
Bst71I MnlI NdeII BsaJI AfaI BseNI BssAI HpaII BshNI RsaI BstX2I DpnI MnlI  
ItaI ErhI BseDI Bsp143I RsaI BsrSI PspN4I HapII AccB1I KpnI MboI Kzo9I  
cactccctcggtgggtggtactggtgcccgtatgggtacccttctcatcagcaagatccgtgaggagtcccagac base  
pairs  
gtgagggagccaccaccatgaccacggccatacccatgggaagagtagtgcgttctaggcactcctcaagggctcg 676 to  
750

BbvI StyI DpnII Kzo9I XcmI Bani BselI Cfr10I Eco64I NlaIV DpnII MflI AlwI  
Fsp4HI BssT1I MboI DpnI MnlI BshNI NlaIV BsiSI Bani Csp6I BstYI Bsp143I BseRI  
Eco130I EcoT14I HphI Csp6I AccB1I BsrFI MspI Acc65I PspN4I Sau3AI AclWI

Hsp92II MscI  
BslI HaeIII  
AciI EaeI Pali Bali NlaIII Tth111I CviJI  
cgcatgatggccacattctccgtcatgccatctccaaaggtgtccgacaccgtcgttgagccatacaacgccact base  
pairs  
gcgtactaccggtgtaagaggcagtagcgttagaggtttccacaggctgtggcagcaactcggtatgttgcggtga 751 to  
825

Bsc4I CfrI MluNI Hsp92II AspI  
NlaIII BsuRI  
BsiYI CviJI

AluI TaqI **Bsh1236I** HhaI Csp6I  
HphI TthHB8I BstUI Hin6I HaeII  
ThaI TthHB8I HinP1I BstH2I MslI  
gtccgttcaccagctcgtcgagaactccgacgcgaccttctgtatcgacaacgagggcgtgtacgacatttgc base pairs  
caggcaagtgggtcgagcagctcttgaggctgcgctggaagacatagctgttgctccgcgacatgctgtaaacy 826 to 900

CviJI AccII TaqI HspAI Bsp143II  
Mvni HgaI MnlI CfoI AfaI  
AspLEI RsaI

HspAI NspI AspLEI AciI HpaII  
NlaIII SphI CfoI BsiYI BsmBI BsaWI Tsp45I  
PaeI BbuI Acc16I Bsc4I MnlI Alw26I NlaIII HapII  
atgcgcactctgaagctcaacaacctcttacggcgacttgaaccacctcgtctccgccgtcatgtccgggtgtg base  
pairs  
tacgcgtgagacttcgagttggtggtagaatgccgctgaacttggtggagcagagggcggcagtagcagccacac 901 to  
975

Cac8I Hin6I HhaI AluI BslI BsmAI Hsp92II  
HinP1I FspI Eco57I Esp3I BsiSI  
Hsp92II AviII CviJI MspI MaeIII

BstOI AluI Bsp143I FspI Cac8I BshNI PspN4I  
Eam1105I EcoRII MvaI MboI DpnI AviII HindIII NlaIII  
AhdI BsaJI Bst2UI DpnII MwoI Acc16I AluI Eco64I  
acaacctgtctgcgtttcccaggtcagctcaacagcagatctgcgcaagcttgccgtgaacatgggtgcccgttccca base  
pairs

tgttgacagacgcaaaggggtccagtcgagttgtcgctagacgcggttcgaacggcacttgtaccacggcaaggggt 976 to  
 1050  
 EclHKI BseDI ScrFI NdeII HinPII AspLEI BanI NlaIV  
 AspEI BstNI CviJI Sau3AI Hin6I CfoI Hsp92II  
 MspR9I Kzo9I HspAI HhaI CviJI AccBII  
 BseDI AspLEI  
 BsmBI Hsp92II CviJI HspAI HphI  
 MaeII Alw26I MboII MaeI DsaI Hin6I Tsp45I  
 cgtctccacttcttcatggttggtttcgaccactcactagccgtggcgacactccttccgtgctgtcaccggt base  
 pairs  
 gcagaggtgaagaagtaaccaacaaagcgtggtgagtgatcggcaccgcgtgtgaggaaggcagcagctggcaa 1051 to  
 1125  
 BsmAI NlaIII BfaI HinPII MaeIII  
 Esp3I BsaJI HhaI  
 BstDSI CfoI  
 SduI Bbv12I Alw21I MboII HaeIII AciI EagI CviJI BstMCI  
 AluI AspHI FriOI HphI Hsp92II Fsp4HI BstZI Pali Bsh1285I  
 Ecl136II Psp124BI TthHB8I XcmI EaeI Pali Cac8I AciI EclXI BsiEI  
 ccagagctcaccagcaaatcttcgacccaagaacatgatggccgacgacttccgcaacggccgttacctc base  
 pairs  
 ggtctcgagtggtgctttagaagctgggttcttgtactaccggcggtcgctgaaggcggttgccggcaatggag 1126 to  
 1200  
 CviJI BmyI SacI BsiHKAI NlaIII BsuRI MwoI EaeI Eco52I  
 EcoICRI Eco24I SstI TaqI CfrI BsoFI CfrI HaeIII  
 Bsp1286I BanII MwoI CviJI ItaI XmaIII BsuRI  
 NlaIII HgiEI AspS9I MflI AclWI  
 BstDSI BsaI Bme18I BstYI Sau3AI AlwI  
 CviJI BsaJI BslI Alw26I Cfr13I MnlI NdeII Kzo9I  
 acttgctcggctatctaccgtggcaaggtctccatgaaggaagttgaggaccagatccgcaacgtgcagaacaag base  
 pairs  
 tgaacgagccgatagatggcaccggtccagaggtacttcttcaactcctggtctagggcgttgacagcttctgttc 1201 to  
 1275  
 BsaOI BseDI BsiYI Eco31I SinI AvaII BstX2I DpnI MaeII  
 MaeIII DsaI Bsc4I BsmAI Sau96I DpnII Bsp143I AciI  
 MnlI Hsp92II AsuI Eco47I MboI XhoII BsgI  
 BmyI AccII ItaI  
 Bsp1286I BslI Bsh1236I  
 TspRI TthHB8I MaeII AciI SduI BsiHKAI ThaI BsoFI  
 aacctgcctacttctcgtcgagtggttccaaacaacgtccagaccgactgtgctctatcccaccacgcccctc base  
 pairs  
 ttgtgacggatgaagcagctcacctaaggtttgttgaggtctggcgtgacacgagataggggtggtgcgccggag 1276 to  
 1350  
 TaqI HinfI TspRI Alw21I Bsc4I MvnI  
 AspHI BsiYI Fsp4HI  
 Bbv12I BstUI HaeIII  
 BsuRI MboII MboI Kzo9I MspR9I AluI AspHI BanII SapI  
 MnlI BbsI DpnII DpnI AclWI Ecl136II Eco24I BsiHKAI  
 Pali BpuAI TthHB8I BstNI ScrFI SduI BmyI FriOI Eam11  
 aagatgcttctacctcgttggaacagcacttccgatccaggagctcttcaagcgtgctgggtgaccagttcact base  
 pairs  
 ttctacagaagatggaagcaaccttctcgtggaagctaggtcctcgagaagttcgcacagccactggtaagtga 1351 to

1425  
 CviJI Bbv16II TaqI Bsp143I Bst2UI Bsp1286I SacI SstI Ea  
 AciI BpiI NdeII EcoRII AlwI CviJI Bbv12I Alw21I MboII  
 Sau3AI BstOI MvaI EcoICRI Psp124BI Ksp632I

MwoI Tsp45I BsrI Bsc4I HhaI StuI Ecol47I BsrI BseNI DdeI  
 Eco91I MaeIII TspRI HinP1I Pme55I SseBI BselI BsrI TspRI  
 04I EcoO65I BselI BslI HspAI AatI BsuRI Csp6I BsrSI DdeI CviJI  
 gccatgttcaggcgcaaggccttcttgactggtacactggcgagggtatggacgagatggagttcactgaggct base  
 pairs  
 cggtacaagtccgcggtccggaagaacgtgacctgtgaccgctcccatacctgctctacctcaagtgactccga 1426 to  
 1500

rI BstEII BsrSI NlaIII Hin6I HaeIII TspRI RsaI BselI BstDEI  
 PspEI BseNI Hsp92II AspLEI Pali BsrSI AfaI MnlI MnlI  
 BstPI HphI MslI BsiYI CfoI CviJI BseNI TspRI BstDEI

BstNI Pme55I BsuRI BsaJI  
 Eam1105I AfaI AfaI ScrFI AatI Ecol47I  
 PleI NlaIII AhdI Csp6I Csp6I MspR9I HaeIII Alw26I MnlI  
 gagtccaacatgaacgacttggtgtccgagtaccagcagtagcaggaggcctctgtctccgagggagaggaggag base  
 pairs  
 ctcaggttgacttgctgaaccacaggctcatggctcatggctcctccggagacagaggctccctctcctcctc 1501 to  
 1575

HinfI Hsp92II EclHKI RsaI RsaI Bst2UI CviJI SseBI MnlI BseRI  
 AspEI EcoRII MvaI Pali MnlI BseDI  
 BstOI StuI MnlI BsmAI

BseRI BbiII Hin6I AspLEI BslI  
 RsaI BanI Hin1I BsaHI EheI HaeII MnlI  
 Csp6I MnlI AccB1I HspAI PspN4I BbeI BsiYI  
 tacgacgaggaggcgccacttgaaggcgaggagtag base pairs  
 atgctgtcctccgcggtgaacttccgctcctcatc 1576 to 1611  
 Eco64I Hsp92I NlaIV Bsp143II BseRI  
 AfaI KasI Msp17I NarI HhaI BstH2I  
 BshNI HinP1I AcyI CfoI Bsc4I

---

**Table by Enzyme Name**

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence	<a href="#">More info</a>
AatI	2	1444 1549	agg/cct	<a href="#">More info</a>
AatII	1	303	gacgt/c	<a href="#">More info</a>
Acc16I	2	904 1018	tgc/gca	<a href="#">More info</a>
Acc65I	1	709	g/gtacc	<a href="#">More info</a>
AccB1I	7	478 553 592 697 709 1038 1587	g/gyrcc	<a href="#">More info</a>
AccB7I	1	46	ccannnn/ntgg	<a href="#">More info</a>
AccI	2	352 605	gt/mkac	<a href="#">More info</a>
AccII	9	45 56 65 147 414 497 632 859 1343	cg/cg	<a href="#">More info</a>
AciI	14	27 46 81 375 498 525 630 753 959 1172 1185 1260 1322 1346	ccgc	<a href="#">More info</a>
AclWI	3	733 1258 1390	ggatc	<a href="#">More info</a>
AcyI	3	300 554 1588	gr/cgyc	<a href="#">More info</a>
AfaI	10	138 312 367 693 711 889 1459	gt/ac	<a href="#">More info</a>

		1531 1540 1576		
AflIII	1	54	a/crygt	<a href="#">More info</a>
AhdI	2	980 1521	gacnnn/nngtc	<a href="#">More info</a>
AluI	10	335 408 516 600 840 915 1002 1023 1131 1395	ag/ct	<a href="#">More info</a>
Alw21I	5	388 602 1133 1330 1397	gwgw/c	<a href="#">More info</a>
Alw26I	5	104 956 1056 1232 1559	gtctc	<a href="#">More info</a>
AlwI	3	733 1258 1390	ggatc	<a href="#">More info</a>
AlwNI	1	296	cagnnn/ctg	<a href="#">More info</a>
Ama87I	3	164 336 403	c/ycgrg	<a href="#">More info</a>
Asp718I	1	709	g/gtacc	<a href="#">More info</a>
AspEI	2	980 1521	gacnnn/nngtc	<a href="#">More info</a>
AspHI	5	388 602 1133 1330 1397	gwgw/c	<a href="#">More info</a>
AspI	1	799	gacn/nngtc	<a href="#">More info</a>
AspLEI	10	149 343 499 556 885 905 1019 1099 1439 1590	gcg/c	<a href="#">More info</a>
AspS9I	3	502 569 1248	g/gncc	<a href="#">More info</a>
AsuI	3	502 569 1248	g/gncc	<a href="#">More info</a>
AtsI	1	799	gacn/nngtc	<a href="#">More info</a>
AvaI	3	164 336 403	c/ycgrg	<a href="#">More info</a>
AvaII	2	502 1248	g/gwcc	<a href="#">More info</a>
AviII	2	904 1018	tgc/gca	<a href="#">More info</a>
BalI	1	760	tgg/cga	<a href="#">More info</a>
BanI	7	478 553 592 697 709 1038 1587	g/gyrcc	<a href="#">More info</a>
BanII	3	602 1133 1397	grgcy/c	<a href="#">More info</a>
BbeI	2	557 1591	ggcgc/c	<a href="#">More info</a>
BbiII	3	300 554 1588	gr/cgyc	<a href="#">More info</a>
BbrPI	1	451	cac/gtg	<a href="#">More info</a>
BbsI	2	543 1361	gaagac	<a href="#">More info</a>
BbuI	1	903	gcatg/c	<a href="#">More info</a>
Bbv12I	5	388 602 1133 1330 1397	gwgw/c	<a href="#">More info</a>
Bbv16II	2	543 1361	gaagac	<a href="#">More info</a>
BbvI	3	209 294 648	gcagc	<a href="#">More info</a>
BcoI	3	164 336 403	c/ycgrg	<a href="#">More info</a>
BfaI	1	1088	c/tag	<a href="#">More info</a>
BglI	2	245 551	gccnnnn/nggc	<a href="#">More info</a>
Bme18I	2	502 1248	g/gwcc	<a href="#">More info</a>
BmyI	6	54 388 602 1133 1330 1397	gdgch/c	<a href="#">More info</a>
BpiI	2	543 1361	gaagac	<a href="#">More info</a>
BpmI	1	335	ctggag	<a href="#">More info</a>
BpuAI	2	543 1361	gaagac	<a href="#">More info</a>
BsaAI	2	140 451	yac/gtr	<a href="#">More info</a>
BsaHI	3	300 554 1588	gr/cgyc	<a href="#">More info</a>
BsaI	1	1232	ggtctc	<a href="#">More info</a>
BsaJI	10	185 482 572 638 657 681 993 1092 1218 1559	c/cnngg	<a href="#">More info</a>
BsaMI	1	213	gaatgc	<a href="#">More info</a>
BsaOI	1	1191	cgry/cg	<a href="#">More info</a>
BsaWI	2	430 967	w/ccggw	<a href="#">More info</a>
Bsc4I	8	45 632 755 930 1223 1341 1432 1596	ccnnnn/nnngg	<a href="#">More info</a>
Bsel18I	2	125 700	r/ccggy	<a href="#">More info</a>
BselI	7	134 550 570 698 1420 1458 1466	actgg	<a href="#">More info</a>
BseDI	10	185 482 572 638 657 681 993 1092 1218 1559	c/cnngg	<a href="#">More info</a>
BseNI	7	134 550 570 698 1420 1458 1466	actgg	<a href="#">More info</a>

BseRI	4	741 1572 1587 1608	gaggag	<a href="#">More info</a>
BsgI	3	267 310 1269	gtgcag	<a href="#">More info</a>
Bsh1236I	9	45 56 65 147 414 497 632 859 1343	cg/cg	<a href="#">More info</a>
Bsh1285I	1	1191	cgry/cg	<a href="#">More info</a>
BshNI	7	478 553 592 697 709 1038 1587	g/gyrcc	<a href="#">More info</a>
BsiEI	1	1191	cgry/cg	<a href="#">More info</a>
BsiHKAI	5	388 602 1133 1330 1397	gwgwc/c	<a href="#">More info</a>
BsiSI	7	126 227 431 551 557 701 968	c/cgg	<a href="#">More info</a>
BsiYI	8	46 633 756 931 1224 1342 1433 1597	ccnnnnn/nngg	<a href="#">More info</a>
BslI	8	46 633 756 931 1224 1342 1433 1597	ccnnnnn/nngg	<a href="#">More info</a>
BsmAI	5	104 956 1056 1232 1559	gtctc	<a href="#">More info</a>
BsmBI	2	956 1056	cgtctc	<a href="#">More info</a>
BsmFI	1	449	gggac	<a href="#">More info</a>
BsmI	1	213	gaatgc	<a href="#">More info</a>
BsoBI	3	164 336 403	c/ycgrg	<a href="#">More info</a>
BsoFI	7	79 206 291 630 645 1169 1344	gc/ngc	<a href="#">More info</a>
Bsp1286I	6	54 388 602 1133 1330 1397	gdgch/c	<a href="#">More info</a>
Bsp143I	5	668 728 1011 1253 1385	/gatc	<a href="#">More info</a>
Bsp143II	3	557 886 1591	rgcgc/y	<a href="#">More info</a>
Bsp19I	1	482	c/catgg	<a href="#">More info</a>
Bsp68I	1	65	tcg/cga	<a href="#">More info</a>
BspMI	1	312	acctgc	<a href="#">More info</a>
BsrDI	1	279	gcaatg	<a href="#">More info</a>
BsrFI	2	125 700	r/ccggy	<a href="#">More info</a>
BsrI	7	134 550 570 698 1420 1458 1466	actgg	<a href="#">More info</a>
BsrSI	7	134 550 570 698 1420 1458 1466	actgg	<a href="#">More info</a>
BssAI	2	125 700	r/ccggy	<a href="#">More info</a>
BssT1I	4	185 482 572 657	c/cwgg	<a href="#">More info</a>
Bst2UI	5	476 610 995 1390 1543	cc/wgg	<a href="#">More info</a>
Bst71I	3	209 294 648	gcagc	<a href="#">More info</a>
BstDEI	2	1493 1499	c/tnag	<a href="#">More info</a>
BstDSI	3	482 1092 1218	c/crygg	<a href="#">More info</a>
BstEII	1	1411	g/gtnacc	<a href="#">More info</a>
BstF5I	1	490	ggatg	<a href="#">More info</a>
BstH2I	3	557 886 1591	rgcgc/y	<a href="#">More info</a>
BstMCI	1	1191	cgry/cg	<a href="#">More info</a>
BstNI	5	476 610 995 1390 1543	cc/wgg	<a href="#">More info</a>
BstOI	5	476 610 995 1390 1543	cc/wgg	<a href="#">More info</a>
BstPI	1	1411	g/gtnacc	<a href="#">More info</a>
BstSNI	1	140	tac/gta	<a href="#">More info</a>
BstUI	9	45 56 65 147 414 497 632 859 1343	cg/cg	<a href="#">More info</a>
BstX2I	2	728 1253	r/gatcy	<a href="#">More info</a>
BstYI	2	728 1253	r/gatcy	<a href="#">More info</a>
BstZI	1	1188	c/ggccg	<a href="#">More info</a>
BsuRI	12	129 239 512 545 571 637 760 1168 1190 1346 1444 1549	gg/cc	<a href="#">More info</a>
Cac8I	6	54 372 514 901 1021 1173	gcn/ngc	<a href="#">More info</a>
CfoI	10	149 343 499 556 885 905 1019 1099 1439 1590	gcg/c	<a href="#">More info</a>
Cfr10I	2	125 700	r/ccggy	<a href="#">More info</a>
Cfr13I	3	502 569 1248	g/gncc	<a href="#">More info</a>
CfrI	6	127 510 543 758 1166 1188	y/ggcsr	<a href="#">More info</a>

Csp6I	10	137 311 366 692 710 888 1458	g/tac	<a href="#">More info</a>
		1530 1539 1575		
CviJI	30	129 239 248 335 408 427 474 512	rg/cy	<a href="#">More info</a>
		516 545 571 600 637 644 760 810		
		840 915 1002 1023 1091 1131 1168		
		1190 1210 1346 1395 1444 1498		
		1549		
DdeI	2	1493 1499	c/tnag	<a href="#">More info</a>
DpnI	5	670 730 1013 1255 1387	ga/tc	<a href="#">More info</a>
DpnII	5	668 728 1011 1253 1385	/gatc	<a href="#">More info</a>
DraIII	1	46	cacnnn/gtg	<a href="#">More info</a>
DrdI	1	535	gacnnnn/nngtc	<a href="#">More info</a>
DsaI	3	482 1092 1218	c/crygg	<a href="#">More info</a>
EaeI	6	127 510 543 758 1166 1188	y/ggCCR	<a href="#">More info</a>
EagI	1	1188	c/ggCCG	<a href="#">More info</a>
Eam1104I	1	1401	ctcttc	<a href="#">More info</a>
Eam1105I	2	980 1521	gacnnn/nngtc	<a href="#">More info</a>
EarI	1	1401	ctcttc	<a href="#">More info</a>
Ecl136II	3	600 1131 1395	gag/ctc	<a href="#">More info</a>
EclHKI	2	980 1521	gacnnn/nngtc	<a href="#">More info</a>
EclXI	1	1188	c/ggCCG	<a href="#">More info</a>
Eco105I	1	140	tac/gta	<a href="#">More info</a>
Eco130I	4	185 482 572 657	c/cwwgg	<a href="#">More info</a>
Eco147I	2	1444 1549	agg/cct	<a href="#">More info</a>
Eco24I	3	602 1133 1397	grgcy/c	<a href="#">More info</a>
Eco31I	1	1232	ggtctc	<a href="#">More info</a>
Eco47I	2	502 1248	g/gwcc	<a href="#">More info</a>
Eco52I	1	1188	c/ggCCG	<a href="#">More info</a>
Eco57I	2	592 915	ctgaag	<a href="#">More info</a>
Eco64I	7	478 553 592 697 709 1038 1587	g/gyrcc	<a href="#">More info</a>
Eco72I	1	451	cac/gtg	<a href="#">More info</a>
Eco88I	3	164 336 403	c/ycgrg	<a href="#">More info</a>
Eco91I	1	1411	g/gtnacc	<a href="#">More info</a>
EcoICRI	3	600 1131 1395	gag/ctc	<a href="#">More info</a>
EcoO65I	1	1411	g/gtnacc	<a href="#">More info</a>
EcoRII	5	474 608 993 1388 1541	/ccwgg	<a href="#">More info</a>
EcoT14I	4	185 482 572 657	c/cwwgg	<a href="#">More info</a>
EheI	2	555 1589	ggc/gcc	<a href="#">More info</a>
ErhI	4	185 482 572 657	c/cwwgg	<a href="#">More info</a>
Esp1396I	1	46	ccannnn/ntgg	<a href="#">More info</a>
Esp3I	2	956 1056	cgtctc	<a href="#">More info</a>
FauI	1	375	cccgc	<a href="#">More info</a>
FokI	1	490	ggatg	<a href="#">More info</a>
FriOI	3	602 1133 1397	grgcy/c	<a href="#">More info</a>
Fsp4HI	7	79 206 291 630 645 1169 1344	gc/ngc	<a href="#">More info</a>
FspI	2	904 1018	tgc/gca	<a href="#">More info</a>
GsuI	1	335	ctggag	<a href="#">More info</a>
HaeII	3	557 886 1591	rgcgc/y	<a href="#">More info</a>
HaeIII	12	129 239 512 545 571 637 760 1168	gg/cc	<a href="#">More info</a>
		1190 1346 1444 1549		
HapII	7	126 227 431 551 557 701 968	c/cgg	<a href="#">More info</a>
HgaI	2	415 860	gacgc	<a href="#">More info</a>
HgiEI	2	502 1248	g/gwcc	<a href="#">More info</a>
HhaI	10	149 343 499 556 885 905 1019	gcg/c	<a href="#">More info</a>
		1099 1439 1590		
Hin1I	3	300 554 1588	gr/cgyc	<a href="#">More info</a>



Hin6I	10	147 341 497 554 883 903 1017 1097 1437 1588	g/cgc	<a href="#">More info</a>
HinP1I	10	147 341 497 554 883 903 1017 1097 1437 1588	g/cgc	<a href="#">More info</a>
HincII	1	606	gty/rac	<a href="#">More info</a>
HindII	1	606	gty/rac	<a href="#">More info</a>
HindIII	1	1021	a/agctt	<a href="#">More info</a>
HinfI	5	15 98 162 1299 1501	g/antc	<a href="#">More info</a>
HpaII	7	126 227 431 551 557 701 968	c/cgg	<a href="#">More info</a>
HphI	6	25 675 838 1122 1137 1415	ggtga	<a href="#">More info</a>
Hsp92I	3	300 554 1588	gr/cgyc	<a href="#">More info</a>
Hsp92II	13	238 347 486 756 777 903 966 1038 1068 1164 1236 1431 1512	catg/	<a href="#">More info</a>
HspAI	10	147 341 497 554 883 903 1017 1097 1437 1588	g/cgc	<a href="#">More info</a>
ItaI	7	79 206 291 630 645 1169 1344	gc/ngc	<a href="#">More info</a>
KasI	2	553 1587	g/gcgcc	<a href="#">More info</a>
KpnI	1	713	ggtac/c	<a href="#">More info</a>
Ksp632I	1	1401	ctcttc	<a href="#">More info</a>
Kzo9I	5	668 728 1011 1253 1385	/gatc	<a href="#">More info</a>
MaeI	1	1088	c/tag	<a href="#">More info</a>
MaeII	8	139 300 321 349 450 1050 1262 1310	a/cgt	<a href="#">More info</a>
MaeIII	6	433 577 972 1116 1192 1411	/gtnac	<a href="#">More info</a>
MboI	5	668 728 1011 1253 1385	/gatc	<a href="#">More info</a>
MboII	5	543 1065 1149 1361 1401	gaaga	<a href="#">More info</a>
MflI	2	728 1253	r/gatcy	<a href="#">More info</a>
MluI	1	54	a/cgcgt	<a href="#">More info</a>
MluNI	1	760	tgg/cca	<a href="#">More info</a>
MnlI	24	22 243 332 366 462 508 637 643 657 684 739 883 951 1200 1249 1350 1471 1498 1549 1553 1564 1570 1585 1606	cctc	<a href="#">More info</a>
MscI	1	760	tgg/cca	<a href="#">More info</a>
MslI	2	898 1426	caynn/nnrtg	<a href="#">More info</a>
Msp17I	3	300 554 1588	gr/cgyc	<a href="#">More info</a>
MspI	7	126 227 431 551 557 701 968	c/cgg	<a href="#">More info</a>
MspR9I	5	476 610 995 1390 1543	cc/ngg	<a href="#">More info</a>
Mva1269I	1	213	gaatgc	<a href="#">More info</a>
MvaI	5	476 610 995 1390 1543	cc/wgg	<a href="#">More info</a>
MvnI	9	45 56 65 147 414 497 632 859 1343	cg/cg	<a href="#">More info</a>
MwoI	10	32 62 236 496 551 650 1016 1137 1181 1401	gcnnnnn/nngc	<a href="#">More info</a>
NarI	2	554 1588	gg/cgcc	<a href="#">More info</a>
NcoI	1	482	c/catgg	<a href="#">More info</a>
NdeII	5	668 728 1011 1253 1385	/gatc	<a href="#">More info</a>
NlaIII	13	238 347 486 756 777 903 966 1038 1068 1164 1236 1431 1512	catg/	<a href="#">More info</a>
NlaIV	8	473 480 555 594 699 711 1040 1589	ggn/ncc	<a href="#">More info</a>
NruI	1	65	tcg/cga	<a href="#">More info</a>
NspI	1	903	rcatg/y	<a href="#">More info</a>
PaeI	1	903	gcatg/c	<a href="#">More info</a>
PaeR7I	2	336 403	c/tcgag	<a href="#">More info</a>
PalI	12	129 239 512 545 571 637 760 1168	gg/cc	<a href="#">More info</a>

		1190 1346 1444 1549		
PflMI	1	46	ccannnn/ntgg	<a href="#">More info</a>
PleI	4	19 102 166 1505	gagtc	<a href="#">More info</a>
PmaCI	1	451	cac/gtg	<a href="#">More info</a>
Pme55I	2	1444 1549	agg/cct	<a href="#">More info</a>
PmlI	1	451	cac/gtg	<a href="#">More info</a>
PshAI	1	299	gacnn/nngtc	<a href="#">More info</a>
Psp124BI	3	602 1133 1397	gagct/c	<a href="#">More info</a>
PspEI	1	1411	g/gtnacc	<a href="#">More info</a>
PspN4I	8	473 480 555 594 699 711 1040 1589	ggn/ncc	<a href="#">More info</a>
RsaI	10	138 312 367 693 711 889 1459 1531 1540 1576	gt/ac	<a href="#">More info</a>
SacI	3	602 1133 1397	gagct/c	<a href="#">More info</a>
SalI	1	604	g/tcgac	<a href="#">More info</a>
SapI	1	1401	gctcttc	<a href="#">More info</a>
Sau3AI	5	668 728 1011 1253 1385	/gatc	<a href="#">More info</a>
Sau96I	3	502 569 1248	g/gncc	<a href="#">More info</a>
ScrFI	5	476 610 995 1390 1543	cc/ngg	<a href="#">More info</a>
SduI	6	54 388 602 1133 1330 1397	gdgch/c	<a href="#">More info</a>
SexAI	1	608	a/ccwgg	<a href="#">More info</a>
SfaNI	2	36 491	gcatc	<a href="#">More info</a>
Sfr274I	2	336 403	c/tcgag	<a href="#">More info</a>
SinI	2	502 1248	g/gwcc	<a href="#">More info</a>
SnaBI	1	140	tac/gta	<a href="#">More info</a>
SphI	1	903	gcatg/c	<a href="#">More info</a>
Sse9I	1	173	/aatt	<a href="#">More info</a>
SseBI	2	1444 1549	agg/cct	<a href="#">More info</a>
SstI	3	602 1133 1397	gagct/c	<a href="#">More info</a>
StuI	2	1444 1549	agg/cct	<a href="#">More info</a>
StyI	4	185 482 572 657	c/cwgg	<a href="#">More info</a>
TaqI	14	103 155 242 337 398 404 464 605 617 845 872 1148 1292 1384	t/cga	<a href="#">More info</a>
TfiI	1	1299	g/awtc	<a href="#">More info</a>
ThaI	9	45 56 65 147 414 497 632 859 1343	cg/cg	<a href="#">More info</a>
Tsp45I	4	577 972 1116 1411	/gtsac	<a href="#">More info</a>
Tsp509I	1	173	/aatt	<a href="#">More info</a>
TspEI	1	173	/aatt	<a href="#">More info</a>
TspRI	8	89 135 1282 1326 1426 1457 1465 1495	cagtg	<a href="#">More info</a>
Tth111I	1	799	gacn/nngtc	<a href="#">More info</a>
TthHB8I	14	103 155 242 337 398 404 464 605 617 845 872 1148 1292 1384	t/cga	<a href="#">More info</a>
Van91I	1	46	ccannnn/ntgg	<a href="#">More info</a>
XcmI	2	682 1161	ccannnnn/nnntgg	<a href="#">More info</a>
XhoI	2	336 403	c/tcgag	<a href="#">More info</a>
XhoII	2	728 1253	r/gatcy	<a href="#">More info</a>
XmaIII	1	1188	c/ggccg	<a href="#">More info</a>

The following endonucleases were selected but don't cut this sequence:

Acc113I, AccBSI, AccIII, AclNI, AcsI, AfeI, AflII, AgeI, Alw44I, AocI, Aor51HI, ApaI, ApaLI, ApoI, AscI, AseI, AsnI, Asp700I, AvrII, BamHI, BanIII, BcgI, BclI, BcnI, BfrI, BglII, BlnI, BlpI, Bpu1102I, Bpu14I, Bsa29I, BsaBI, BscI, Bse21I, Bse8I, BseAI, BseCI, BsePI, Bsh1365I, BsiI, BsiMI, BsiWI,

Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp1720I, BspCI, BspDI, BspEI, BspHI, BspLU11I, BspTI, BspXI, BsrBI, BsrBRI, BsrGI, BssHII, BssSI, Bst1107I, Bst98I, BstBI, BstD102I, BstI, BstSFI, BstXI, Bsu15I, Bsu36I, CciNI, CelII, Cfr42I, Cfr9I, ClaI, CpoI, Csp45I, CspI, CvnI, DraI, DraII, Eco255I, Eco32I, Eco47III, Eco81I, EcoNI, EcoO109I, EcoRI, EcoRV, EcoT22I, FauNDI, FbaI, FseI, HpaI, Kpn2I, Ksp22I, KspI, LspI, MamI, MfeI, Mph1103I, MroI, MroNI, MseI, MspAI, MspCI, MunI, NaeI, NciI, NdeI, NgoAIV, NgoMI, NheI, NotI, NsiI, NspBII, NspV, PacI, Pfl23II, PinAI, Ple19I, PmeI, Ppul0I, PpuMI, PshBI, Psp1406I, Psp5II, PspAI, PspALI, PspLI, PspOMI, PstI, PstNHI, PvuI, PvuII, RcaI, RsrII, SacII, SbfI, ScaI, SfcI, SfiI, Sfr303I, SfuI, SgfI, SgrAI, SmaI, SmiI, SpeI, SplI, SrfI, Sse8387I, SspBI, SspI, SstII, SunI, SwaI, Tru1I, Tru9I, Vha464I, VneI, VspI, XbaI, XmaI, XmnI, Zsp2I

## REFERENCE

1. Agrios, G. N. (2005): Plant pathology. Amsterdam: Academic, 635.
2. Albertini, C., Gredt, M. i Leroux, P. (1999): Mutations of the b-tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acutormis*. Pestic. Biochem. Physiol. 64, 17–23.
3. Anesiadis, T., Karaoglanidis, G. i Tzavella-Klonari, K. (2003): Protective, Curative and Eradicant Activity of the Strobilurine Fungicide Azoxystrobin against *Cercospora beticola* and *Erysiphe betae*. Journal of Phytopathology 151, 647-51.
4. Anonimus (2013): Sredstva za zaštitu bilja u prometu u Srbiji. Biljni lekar 41 (1-2).
5. Avila-Adame, C. i Köller, W. (2002): Disruption of the alternative oxidase gene in *Magnaporthe grisea* and its impact on host infection. Molecular plant-microbe interactions, 15(5), 493-500.
6. Avila-Adame, C. i Köller, W. (2003): Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. Current genetics, 42(6), 332-338.
7. Balaž, F., Stojšin, V. i Gavran, M. (1995): Rezistentnost izolata *Cercospora beticola* (Sacc.) na području Vojvodine prema Impaktu i nekim novijim fungicidima. Drugo jugoslovensko savetovanje o zaštiti bilja. Zbornik rezimea, 97, Vrnjačka Banja, 30.10.- 03.11.

8. Balaž, F. i Stojšin V. (1996): Suzbijanje prouzrokovala pegavosti lišća šećerne repe, Biljni lekar, br. 4, 321- 324.
9. Balaž F., Stojšin V. i Gavran-Starović M. (1999): Sensitivity of *Cercospora beticola* Sacc. in Vojvodina to some fungicides (In Serbian). *Pesticidi* 14, 5-13.
10. Balaž, F., Balaž, J., Tošić, M., Stojšin, V. i Bagi, F. (2010): Fitopatologija. Bolesti ratarskih i povrtarskih biljaka. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
11. Bargabus, R.L., Zidack, N.K., Sherwood, J.E., i Jacobsen, B.J. (2003): Oxidative burst elicited by *Bacillus mycooides* isolate Bac J, a biological control agent, occurs independently of hypersensitive cell death in sugar beet. *Molecular plant-microbe interactions*, 16(12), 1145-1153.
12. Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M. i Parr-Dobrzanski, B. (2002): The strobilurin fungicides. *Pest management science*, 58(7), 649-662.
13. Bolton, M., Birla, K., Rivera-Varas, V., Rudolf, K. i Secor, G. (2012): Characterization of *CbCyp51* from field isolated of *Cercospora beticola*. *Phytopathology* 102, 298-305.
14. Bolton, M., Rivera, V. i Secor, G., (2013): Identification of the G143A mutation associated with QoI resistance in *Cercospora beticola* field isolates from Michigan, United States. *Pest Manag Sci* 69, 35-39.
15. Brent, K.J. i Hollomon, D.J. (2007a): Fungicide resistance: the assessment of risk. FRAC Monograph No.2. Brussels, Belgium: Fungicide Resistance Action Committee.

16. Brent, K.J. i Hollomon, D.J. (2007b): Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed. FRAC Monograph No.1. Brussels, Belgium: Fungicide Resistance Action Committee.
17. Briere, S.C., Franc, G.D. i Kerr, E.D. (2001): Fungicide sensitivity characteristics of *Cercospora beticola* isolates recovered from the high plains of Colorado, Montana, Nebraska and Wyoming. 1. Benzimidazole and Triphenyltin hydroxide. Journal of Sugar Beet Research 38, 111-20.
18. Brown, M.C. i Waller, C.D. (1986): The use of flutriafol based fungicides for the control of sugar beet diseases in Europe. U: 1986 British crop protection conference, pests and diseases, vol. 3, str. 1055-1061
19. Bugbee, W.M. (1995): *Cercospora beticola* tolerant to triphenyltin hydroxide. J. Sugar Beet Res. 32, 167–174.
20. Bugbee, W.M. (1996): *Cercospora beticola* strains from sugar beet tolerant to triphenyltin hydroxide and resistant to thiophanate methyl. Plant Disease, 80(1).
21. Butters, J.A. i Hollomon, D.W. (1999): Resistance to benzimidazole can be caused by changes in  $\beta$ -tubulin isoforms. Pesticide science, 55(4), 501-503.
22. Byford, W.J. (1996): A survey of foliar diseases of sugar beet and their control in Europe. Proceedings of the 59th IIRB Congress, February 1996, pp. 1–10.
23. Campbell, L.G., Smith, G.A., Lamey, H.A. i Cattach A, W. (1998): *Cercospora beticola* tolerant to triphenyltin hydroxide and resistant to thiophanate-methyl in North Dakota and Minnesota. J. Sugar Beet Res. 35, 29–41.

24. Canas-Gutierrez, G.P., Patino, L.F., Rodriguez-Arango, E. i Arango, R. (2006): Molecular characterization of benomyl-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*, collected in Colombia. *Journal of Phytopathology* 154, 403–5.
25. Canova, A. (1959): Researches on the biology and epidemiology of *C. beticola*. Part II. *Annali della Sperimentazione Agraria*, 13(2), 157-203.
26. Caesar-Ton-That, T.C. (2002): Soil binding properties of mucilage produced by a basidiomycete fungus in a model system. *Mycological Research*, 106 (2002), pp. 930–937.
27. Cenis, J.L. (1992): Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucl. Acids Res.* 20: 2380.
28. Cerato, C. i Grassi, G. (1983): Tolerance of organo-tin compounds among *Cercospora beticola* isolates. *Informatore Fitopatologico*, 33, 67–69.
29. Chung, W.H., Chung, W.C., Peng, M.T., Yang, H.R. i Huang, J.W. (2010): Specific detection of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporoides* from fruit crops by PCR-RFLP. *New Biotechnology* 27, 17-24.
30. Chupp, C. (1954): A Monograph of the Fungus Genus *Cercospora*. Ithaca, NY. Published by the author.
31. Cooley, R.N. i Caten, C.E. (1993): Molecular analysis of the *Septoria nodorum* beta tubulin gene and characterization of a benomyl-resistant mutation. *Molecular and General Genetics* 237, 58–64.
32. Corlett, M. (1991): An annotated list of the published names in *Mycosphaerella* and *Sphaerella* (No. 18).

33. Crous, P.W. i Braun, U. (2003): *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
34. Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F., Philips, A.J. i Groenewald, J.Z. (2006): Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in mycology*, 55(1), 235-253.
35. Dahmen, H. i Staub, T. (1992): Protective, curative and eradicator activity of difenoconazole against *Venturia inaequalis*, *Cercospora arachidicola* and *Alternaria solani*. *Plant Disease* 76, 774-7.
36. D'Ambra, V., Mutto, S. i Carula, G. (1974): Sensibilita e tolleranza di isolati di *Cercospora beticola* sensibili e tolleranti al benomyl. *L'Ind. Saccarifera Ital.* 1, 11-13.
37. Davidse, L.C. (1986): Benzimidazole fungicides: mechanisms of action and biological impact. *Annual Review of Phytopathology* 24, 43-65.
38. Davidson, R.M., Hanson, L.E., Franc, G.D. i Panella, L. (2006): Analysis of  $\beta$ -tubuline gene fragments from benzimidazole-sensitive and -tolerant *Cercospora beticola*. *Journal of Phytopathology* 154, 321-8.
39. Dovas, C., Skylakaxis, G. i Georgopoulos, S.G: (1976): The adaptability of the benomyl resistant population of *Cercospora beticola* in Northern Greece. *Phytopathology* 66: 1452-1456
40. Duffus, J.E. i Ruppel, E.G. (1993): Diseases. In *The Sugar Beet Crop* (pp. 347-427). Springer Netherlands.



41. Faostat, FAO Statistics Division (2013): Production of Crops.  
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor/>
42. FRAC (2013): FRAC Code List: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering)  
[http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC\\_CODE\\_LIST.pdf/](http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC_CODE_LIST.pdf/)
43. Franc, G.D. (2010): Ecology and epidemiology of *Cercospora beticola*. *Cercospora leaf spot of sugar beet and related species*, ed. RT Lartey, JJ Weiland, L. Panella, PW Crous, and CE Windels, 7-19.
44. Fujimura, M., Kamakura, T., Inoue, H., Inoue, S. i Yamaguchi, I. (1992): Sensitivity of *Neurospora crassa* to benzimidazoles and *N*-phenylcarbamates: Effect of amino acid substitutions at position 198 in  $\beta$ -tubulin. *Pesticide biochemistry and physiology*, 44(3), 165-173.
45. Fujimura, M., Kamakura, T., Inoue, H. i Yamaguchi, I. (1994): Amino-acid alterations in the  $\beta$ -tubulin gene of *Neurospora crassa* that confer resistance to carbendazim and diethofencarb. *Current genetics*, 25(5), 418-422.
46. Gallian, J.J., Nolte, P. i Miller, J.S. (2001): *Managing fungicide resistance*. University of Idaho.
47. Gavran M. (1991): Rezistentnost *Cercospora beticola* na benzimidazole. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet u Beogradu – Zemunu, pp. 70.
48. Gavran M. (1992): Rezistentnost *Cercospora beticola* Sacc. prema fungicidima iz grupe benzimidazola u nekim lokalitetima Srbije. *Zaštita bilja*, 199: 47-54.

49. Georgopoulos, S.G. i Dovas, C. (1973): Occurrence of *Cercospora beticola* strains resistant to benzimidazole fungicides in northern Greece. *Plant Disease Report*, 62, 321-4.
50. Georgopoulos, S.G. (1977): Development of fungal resistance to fungicides. In: Siegel MR and Sisler HD (eds) *Antifungal Compounds*, Vol II, (pp 439–495) Marcel Dekker, Inc. New York.
51. Georgopoulos, S. G. (1982): Case study 1: *Cercospora beticola* of sugar-beets.
52. Georgopoulos, S.G. i Skylakakis, G. (1986): Genetic variability in fungi and the problem of fungicide resistance. *Crop Protection* 5, 299-305.
53. Giannopolitis, C.N. (1978): Occurrence of strains of *Cercospora beticola* resistant to triphenyltin fungicides in Greece. *Plant Disease Reporter*, 62(3), 205-208.
54. Gisi, U., Pavic, L., Stanger, C., Hugelshofer, U., Sierotzki, H., Dehne, H.W. i Lyr, H. (2005): Dynamics of *Mycosphaerella graminicola* populations in response to selection by different fungicides. In *Modern fungicides and antifungal compounds IV: 14th International Reinhardsbrunn Symposium*, Friedrichroda, Thuringia, Germany, April 25-29, 2004. (pp. 89-101). British Crop Protection Council.
55. Goodwin, S.B., Waalwijk, C., Kema, G.H.J., Cavaletto, J.R. i Zhang, G. (2003): Cloning and analysis of the mating-type idiomorphs from the barley pathogen *Septoria passerinii*. *Molecular Genetics and Genomics*, 269(1), 1-12.
56. Groenewald, M., Groenewald, J.Z. i Crous, P.W. (2005): Distinct species exist within the *Cercospora apii* morphotype. *Phytopathology*, 95(8), 951-959.

57. Groenewald, M., Groenewald, J.Z., Harrington, T.C., Abeln, E. C. i Crous, P.W. (2006): Mating type gene analysis in apparently asexual *Cercospora* species is suggestive of cryptic sex. *Fungal Genetics and Biology*, 43(12), 813-825.
58. Groenewald, M., Groenewald, J.Z., Linde, C.C. i Crous, P.W. (2007): Development of polymorphic microsatellite and single nucleotide polymorphism markers for *Cercospora beticola* (*Mycosphaerellaceae*). *Molecular Ecology Notes*, 7(5), 890-892.
59. Halsted, B.D. (1895): Notes on Agriculture (I.). *Science, New Series* 1: 376-379.
60. Halsted, B.D. (1899): Mycological notes – V. *Bull. Torrey Bot. Club* 26: 72-78.
61. Hanson, L. (2010): Genetics of fungicide resistance in *Cercospora* and *Mycosphaerella*. In: Lartey R, Weiland J, Panella L, Crous P, Windels C, eds. *Cercospora leaf spot of sugar beet and related species*. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press, 179-88.
62. Hoffmann, C., (1997): Wachstumsanalyse von Zuckerrüben bei langjährig differenzierter Bodenbearbeitung. *Pflanzenbauwiss.* 1, 164—170.
63. Holtschulte, B., Asher, M. J. C., Molard, M. R., Rosso, F., Steinrücken, G. i Beckers, R. (2000): *Cercospora beticola*-worldwide distribution and incidence. *Cercospora beticola* Sacc. biology, agronomic influence and control measures in sugar beet., 5-16.
64. Ioannidis, P.M. i Karaoglanidis, G.S. (2000): Resistance of *Cercospora beticola* to fungicides. In: Asher, M.J.C., Holtschulte, B., Molard, R.M., Rosso, F., Steinrücken, G., Beckers, R. (Eds.), *Cercospora beticola* Sacc. Biology,

- Agronomic Influence and Control Measures in Sugar Beet. *Advances in Sugar Beet Research*, Vol. 2. I.I.R.B. Publications, Brussels, Belgium, pp. 123–145.
65. Ishii, H. (2006): Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 40(3), 205.
66. Jacobsen, B.J., Zidack, N.K. i Larson, B.J. (2004): The role of Bacillus-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases. *Phytopathology*, 94(11), 1272-1275.
67. Jacobsen, B. i Franc, G. (2009): Cercospora leaf spot. In: Harveson RM, Hanson LE, Hein GL, eds. *Compendium of beet diseases and pests*. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press, 7-10.
68. Jo, Y.K., Niver, A.L., Rimelspach, J.W. i Boehm, M.J. (2006): Fungicide sensitivity of *Sclerotinia homoeocarpa* from golf courses in Ohio, *Plant Disease* 90, 807–813.
69. Karaoglanidis, G.S., Ioannidis, P.M. i Thanassoulopoulos, C.C. (2000): Reduced sensitivity of *Cercospora beticola* to sterol-demethylation-inhibiting fungicides. *Plant Pathol*, 49, 567–572.
70. Karaoglanidis, G.S., Ioannidis, P.M. i Thanassoulopoulos, C.C. (2002): Changes in sensitivity of *Cercospora beticola* populations to sterol-demethylation-inhibiting fungicides during a 4-year period in northern Greece. *Plant pathology*, 51(1), 55-62.
71. Karaoglanidis, G.S. i Thanassoulopoulos, C.C. (2003): Cross-resistance patterns among sterol biosynthesis inhibiting fungicides (SBIs) in *Cercospora beticola*. *European journal of plant pathology*, 109(9), 929-934.

72. Karaoglanidis, G.S., Karadimos, D.A., Ioannidis, P.M. i Ioannidis, P.I. (2003): Sensitivity of *Cercospora beticola* populations to fentin-acetate, benomyl and flutriafol in Greece. *Crop protection*, 22(5), 735-740.
73. Karaoglanidis, G. i Bardas, G. (2006): Control of Benzimidazol- and DMI-Resistant Strains of *Cercospora beticola* with strobilurin fungicides. *Plant Disease* 90, 419-24.
74. Karaoglanidis, G.S. i Ioannidis, P. (2010): Fungicide resistance of *Cercospora beticola* in Europe. In: Lartey R, Weiland J, Panella L, Crous P, Windels C, eds. *Cercospora leaf spot of sugar beet and related species*. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press, 189-211.
75. Kendall, S.J., Hollomon, D.W., Cooke, L.R. i Jones, D.R. (1993): Changes in sensitivity to DMI fungicides in *Rhynchosporium secalis*. *Crop Protection*, 12(5), 357-362.
76. Khan, M. i Smith, L. (2005): Evaluating Fungicides for controlling of *Cercospora* leaf spot on sugar beet. *Crop Protection* 24, 79-86.
77. Khan, J., Del Río, L. E., Nelson, R. i Khan, M.F.R. (2007): Improving the *Cercospora* leaf spot management model for sugar beet in Minnesota and North Dakota. *Plant Disease*, 91(9), 1105-1108.
78. Khan, J., Rio, L.D., Nelson, R., Rivera-Varas, V., Secor, G.A. i Khan, M.F.R. (2008): Survival, dispersal, and primary infection site for *Cercospora beticola* in sugar beet. *Plant Disease*, 92(5), 741-745.
79. Kirk, W.W., Hanson, L.E., Franc, G.D., Stump, W.L., Gachango, E.N., Clark, G. i Stewart, J. (2012): First report of strobilurin resistance in *Cercospora beticola* in

sugar beet (*Beta vulgaris*) in Michigan and Nebraska, USA. New Disease Reports. 26, 3

80. Koenraadt, H., Sommerville, S.C. i Jones, A.L. (1992): Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82, 1348-54.
81. Koenraadt, H. i Jones, A. L. (1993): Resistance to benomyl conferred by mutations in codon 198 or 200 of the beta-tubulin gene of *Neurospora crassa* and sensitivity to diethofencarb conferred by codon 198. *Phytopathology*, 83(8), 850-854.
82. Köller, W. i Wubben, J.P. (1989): Variable resistance factors of fungicides acting as sterol demethylation inhibitors. *Pesticide science*, 26(2), 133-145.
83. Larson, J.B. (2004): Integrated management of *Cercospora* leaf spot on sugar beet. Master of Science thesis. Montana State University.
84. Lartey, R.T., Weiland, J.J. i Panella, L. (2010): A Brief History of *Cercospora* Leaf Spot of Sugar Beet. In: Lartey R, Weiland J, Panella L, Crous P, Windels C, eds. *Cercospora leaf spot of sugar beet and related species*. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press.
85. Lawrence, J.S. i Meredith, D.S. (1970): Wind dispersal of conidia of *Cercospora beticola*. *Phytopathology*, 60, 1076–1078.
86. Luck, J.E. i Gillings, M.R. (1995): Rapid identification of benomyl resistant strains of *Botrytis cinerea* using Polymerase Chain Reaction. *Mycological Research* 99, 1483-8.

87. Ma, Z., Yoshimura, M.A. i Michailides, T.J. (2003): Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7145-52.
88. Ma, Z. i Michailides, T.J. (2005): Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24, 853-63.
89. Malandrakis, A.A., Markoglou, A.N., Nikou, D.C., Vontas, J.G. i Ziogas, B.N. (2011): Molecular diagnostic for detecting the cytochrome *b* G143S–Qol resistance mutation in *Cercospora beticola*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 100(1), 87-92.
90. Marić, A. (1969): Pegavost lišća šećerne repe *Cercospora beticola* Sacc. Zadrūzna knjiga Beograd.
91. Marić, A. (1974): Bolesti šećerne repe. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
92. Marić, A., Petrov, M. i Maširević, S. (1976): Occurrence of tolerance in *Cercospora beticola* Sacc to benomyl in Yugoslavia and management practice against this pathogen (in Serbian). *Zaštita bilja* 27, 227-36.
93. Maymon, M., Zveibil, A., Pivonia, S., Minz, D., i Freeman, S. (2006): Identification and characterization of benomyl-resistant and-sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Statice* (*Limonium* spp.). *Phytopathology*, 96(5), 542-548.
94. McKay, M.B. i Pool, V.W. (1918): Field studies of *Cercospora beticola*. *Phytopathology* 8: 119–136.

95. McKinney, H.H. (1923): Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. J. Agr. Res. 26,195-217.
96. Meredith, J.S. (1967): Conidium release and dispersal in *Cercospora beticola*. Phytopathology, 57, 889–893.
97. Meriggi, P., Rosso, F., Ioannides, P.M. i Ayala Garcia, J. (2000): Fungicide treatments against *Cercospora* leaf spot in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Adv. Sugar Beet Res. IIRB, 2, 77–102.
98. Milgroom, M. G. (1996): Recombination and the multilocus structure of fungal populations. Annual review of phytopathology, 34(1), 457-477.
99. Moretti, M., Arnoldi, A., D'agostina, A., Farina, G. i Gozzo, F. (2003): Characterization of field-isolates and derived DMI-resistant strains of *Cercospora beticola*. Mycological research, 107(10), 1178-1188.
100. Moretti, M., Saracchi, M. i Farina, G. (2004): Morphological, physiological and genetic diversity within a small population of *Cercospora beticola* Sacc. Annals of microbiology, 54, 129-150.
101. Moretti, M., Karaoglanidis, G., Saracchi, M., Fontana, A. i Farina, G. (2006): Analysis of genotypic diversity in *Cercospora beticola* Sacc. field isolates. Annals of microbiology, 56(3), 215-221.
102. Moretti, M., Saracchi, M. i Farina, G. (2010): Vegetative Compatibility Groups in *Cercospora beticola*. In: Lartey R, Weiland J, Panella L, Crous P, Windels C, eds. *Cercospora leaf spot of sugar beet and related species*. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press.
103. Nikou, D., Malandrakis, A., Konstantakaki, M., Vontas, J., Markoglou, A., Ziogas, B. (2009): Molecular characterization and detection of overexpressed C-14



- alpha-demethylase-based DMI resistance in *Cercospora beticola* field isolates. Pesticide, biochemistry and physiology 95, 18-27.
104. Pal, V. i Mukhopadhyay, A.N. (1984): Study of the cellulolytic and pectolytic enzymes in nine biological forms of *Cercospora beticola* Sacc. Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung. 19, 263–269.
105. Pool, V.W. i McKay, M.B. (1916a): Climatic conditions as related to *Cercospora beticola*. J. Agric. Res. 6:21-60.
106. Pool, V.W. i McKay, M.B. (1916b): Relation of stomatal movement to infection by *Cercospora beticola*. J. Agric. Res. 5, 1011–1038.
107. Qiu, J., Xu, J., Yu, J., Bi, C., Chen, C. i Zhou, M. (2011): Localisation of the benzimidazole fungicide binding site of *Gibberella zeae*  $\beta$ 2-tubulin studied by site-directed mutagenesis. Pest management science, 67(2), 191-198.
108. Rathaiah, Y. (1977): Stomatal tropism of *Cercospora beticola* in sugarbeet. Phytopathology, 67(3), 358-362.
109. Rossi, V. (1995): Effect of host resistance in decreasing infection rate of *Cercospora* leaf spot epidemics on sugarbeet. Phytopathologia Med. 34, 149–156.
110. Rossi, V., Battilani, P., Chiusa, G., Giosue, S., Languasco, L. i Racca, P. (2000): Components of rate-reducing resistance to *Cercospora* leaf spot in sugar beet: conidiation length, spore yield. J. Plant Pathol, 82, 125–131.
111. Ruppel, E. G. (1972): Variation among isolates of *Cercospora beticola* from Sugar Beet. Phytopathology, 62(1), 134-136.
112. Ruppel, E.G. i Scott, P.R. (1974): Strains of *Cercospora beticola* resistant to benomyl in the USA Plant Dis. Report, 58, 434–436.

113. Ruppel, E.G. (1975): Biology of benomyl-tolerant strains of *Cercospora beticola* from sugar beet. *Phytopathology*, 65, 785-789.
114. Ruppel, E.G. (1986): *Cercospora* leaf spot. Whitney and JE Duffus, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 8-9.
115. Saccardo, P.A. (1876): *Fungi veneti novi vel critici*. Ser. V, no. 91. *Nuovo Giornale Botanica Italiano*, 8, 161-211.
116. Saghai-Marooif, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. i Allard, R.W. (1984): Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 8010-8018
117. Secor, G.A., Rivera-Varas, V.V., Gudmestad, N.C. i Weiland, J.J. (2010): Sensitivity of *Cercospora beticola* to foliar fungicides in the Red River Valley of North Dakota and Minnesota. In: Larley R, Weiland J, Panella L, Crous P, Windels C, eds. *Cercospora leaf spot of sugar beet and related species*. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press, 213-22.
118. Shane, W.W. i Teng, P.S. (1984): *Cercospora beticola* infection prediction model 1983. *Sugarbeet Res. Ext. Rept.* 14, 174–179.
119. Siegel, M.R. (1981): Sterol-inhibiting fungicides: effects on sterol biosynthesis and sites of action. *Plant Disease* 65, 986-9.
120. Solel, Z. (1970): The systemic fungicidal effect of benzimidazole derivatives and thiophanate against *Cercospora* leafspot of Sugarbeet. *Phytopathology*, 60(8), 1186-1190.

121. Somma, M. (2004): Extraction and purification of DNA. In: M Querci, M Jermini, G Van den Eade (eds.), The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms, special publication 1.03.114 ed. European Commision, Joint Research Centre: Ispra, Italy, Ch. 4
122. Statistički godišnjak Srbije (2012): Republički zavod za statistiku, Beograd, Srbija.
123. Steinkamp, M.P., Martin, S.S., Hoefert, L.L. and Ruppel, E.G. (1979): Ultrastructure of lesions produced by *Cercospora beticola* in leaves of *Beta vulgaris*. *Physiol. Plant Path.* 15, 13–26.
124. Stewart, E.L., Liu, Z., Crous, P.W. i Szabo, L.J. (1999). Phylogenetic relationships among some cercosporoid anamorphs of *Mycosphaerella* based on rDNA sequence analysis. *Mycological Research*, 103(11), 1491-1499.
125. Stojšin, V., Bagi, F., Budakov, D., Balaž, F., Micić, N. (2008): Efikasnost fungicida u suzbijanju pegavosti lišća šećerne repe (*Cercospora beticola* Sacc.) i uticaj na parametre prinosa. *Savremena poljoprivreda* 57 (3-4), 222-228.
126. von Thümen, F. (1886): Die bekämpfung der pilzkrankheiten unserer culturgewächse. Faesy Verlag, Wien.
127. Trkulja, N., Blagojević, J., Ivanović, Ž., Milosavljević, A., Popović, T., Kuzmanović, S. i Bošković, J. (2012): Morphological and breeding characteristics of *Cercospora beticola* isolates. *Zaštita bilja*, 63(1), 45-52.
128. Trkulja, N., Ivanović, Ž., Pfaf-Dolovac, E., Dolovac, N., Mitrović, P., Toševski, I. i Jović, J. (2013): Characterization of benzimidazole resistance of *Cercospora*

- beticola* in Serbia using PCR-based detection of resistance-associated mutations of the  $\beta$ -tubulin gene. *Eur J Plant Pathol* **135**, 889-902.
129. Uesugi, Y. (1979): Resistance of phytopathogenic fungi to fungicides. *Jpn. Pestic. Inf.* 35: 5-9.
130. Vereijssen, J., Schneider, H.J. i Termorshuizen, A.A. (2004): Possible root infection of *Cercospora beticola* in sugar beet. *European journal of plant pathology*, 110(1), 103-106.
131. Vereijssen, J., Schneider, J.H.M. i Jeger, M.J. (2007): Supervised control of *Cercospora* leaf spot in sugar beet. *Crop protection*, 26(1), 19-28.
132. Weiland, J. (1997): Rapid procedure for extraction of DNA from fungal spores and mycelia. *Fungal Genet. Newslet.* 44: 60-63.
133. Weiland, J.J. i Halloin, J.M. (2001): Benzimidazole resistance in *Cercospora beticola* sampled from sugarbeet fields in Michigan, USA. *Can. J. Plant Path.* 23, 78–82.
134. Weiland, J. i Koch, G. (2004): Sugarbeet leaf spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.). *Molecular Plant Pathology* (3), 157–166.
135. Windels, C.E., Lamey, H.A., Hilde, D., Widner, J. i Knudsen T. (1998): A *Cercospora* leaf spot model for sugar beet: in practice by the industry. *Plant Disease* 82, 716-26.
136. Wolf, P.F.J. i Veerret, 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, 336-44.
137. Wolf, P.F.J. i Verreet, J.A. (2005): Factors affecting the onset of *Cercospora* leaf spot epidemics in sugar beet and establishment of disease-monitoring thresholds. *Phytopathology*, 95(3), 269-274.

138. Wolf, P.F.J. i Veerret, J.A. (2010): Quaternary Concept of Integrated Pest Management (IPM) Developed for the Control of *Cercospora* Leaf Spot in Sugar Beet. In: Lartey R, Weiland J, Panella L, Crous P, Windels C, eds. *Cercospora leaf spot of sugar beet and related species*. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press.
139. Yarden, O. i Katan, T. (1993): Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 83, 1478-83.
140. Zhan, J., Kema, G.H.J., Waalwijk, C. i McDonald, B.A. (2002): Distribution of mating type alleles in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* over spatial scales from lesions to continents. *Fungal Genetics and Biology*, 36(2), 128-136.