

Da li je niska efikasnost fungicida uvek posledica razvoja rezistentnosti u populacijama patogena?

Brankica Tanović¹, Jovana Hrustić¹, Mila Grahovac², Milica Mihajlović¹,
Goran Delibašić³ i Petar Vukša³

¹Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Banatska 31b, 11080 Beograd, Srbija
(brankica.tanovic@pesting.org.rs)

²Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000
Novi Sad, Srbija

³Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080 Beograd, Srbija

Primljen: 23. avgusta 2011.

Prihvaćen: 5. oktobra 2011.

REZIME

U radu je ispitivana efikasnost četiri fungicida različitog mehanizma delovanja (vinklozolin, pirimetanil, benomil i fenheksamid) u zaštiti maline od *B. cinerea*. Ogledi su izvedeni na dva lokaliteta u komercijalnim zasadima maline. U slučajevima nezadovoljavajuće efikasnosti fungicida, kvalitativnim i/ili kvantitativnim testom osetljivosti izolata *in vitro*, utvrđeno je da li je niska efikasnost posledica razvoja rezistentnosti populacije patogena. Na oba lokaliteta, najveću efikasnost su ispoljili pirimetanil i fenheksamid (73,2-89,6%), dok je efikasnost vinklozolina bila statistički značajno niža (48,7-63,4%). Međutim, kvalitativni i kvantitativni test osetljivosti na vinklozolin je pokazao da su svi izolati u kategoriji osetljivih na vinklozolin, te da razlog za nezadovoljavajuću efikasnost ovog fungicida treba tražiti pre svega u neadekvatnoj primeni fungicida.

Ključne reči: *B. cinerea*; fungicidi; efikasnost; rezistentnost; osetljivost *in vitro*

UVOD

U poslednjih deset godina Srbija je u samom vrhu svetских proizvođača i izvoznika maline. U periodu 2001-2010. godine prosečno je proizvedeno 79542 tone na oko 15000 ha (Nikolić i Tanović, 2010). Prouzrokovatelj truleži plodova *Botrytis cinerea* značajno ugrožava ovu proizvodnju, a u zavisnosti od vremenskih uslova tokom cvetanja i berbe, gubici u prinosu mogu dostići 50%. Zaštita se uglavnom zasniva na preventivnoj primeni fungici-

da tokom perioda cvetanja (Bielenin, 2002). Za suzbijanje *B. cinerea* uobičajeno se koristi nekoliko visokoefikasnih fungicida. Međutim, proizvođači često prijavljuju slučajeve nedovoljne efikasnosti ovih fungicida u svojoj proizvođačkoj praksi. Razvoj rezistentnosti može da bude jedan od razloga nezadovoljavajućeg učinka fungicida s obzirom da je *B. cinerea* vrsta visokog rizika za rezistentnost na fungicide sa specifičnim mehanizmima delovanja. Međutim, registrovani izostanak efikasnosti fungicida na nekom lokalitetu još uvek ne znači da je on

posledica razvoja rezistentosti, tako da bi u ovim slučajevima laboratorijska testiranja osetljivosti populacija patogena trebalo da pokažu da li je umanjena efikasnost posledica smanjene osetljivosti populacija (Russell, 2004).

U literaturi su ovakva istraživanja obično nepovezana; autori ili ispituju efikasnost pojedinih fungicida ili ispituju osetljivost pojedinačnih izolata iz prirodnih populacija patogena. Cilj ovog rada je da se ispita efikasnost fungicida različitih mehanizama delovanja u zaštiti maline od *B. cinerea* i da se, u slučaju registrovane niske efikasnosti utvrdi da li je ona posledica smanjene osetljivosti populacija patogena. Osetljivost populacija za koje se sumnja da su rezistentne biće upoređena sa osetljivošću populacije patogena iz zasada iz Valjeva koji nikada nije tretiran pesticidima (wild type populatiion). Ova populacija će u radu biti označena kao izvorna populacija, a njena osetljivost će biti definisana kao izvorna osetljivost (baseline sensitivity).

MATERIJAL I METODE

Ispitivanje efikasnosti fungicida

Ispitivanje efikasnosti fungicida izvedeno je tokom maja, juna i jula meseca 2005. godine u komercijalnim zasadima maline na dva lokaliteta – Požega i Šabac. Prethodnih godina u zasadima su primenjivane uobičajene mere suzbijanja *B. cinerea* fungicidima iz grupe benzimidazola i dikarboksimida. Ogladi su postavljeni po modifikovanoj metodi PP 1/16(2) (OEPP/EPP, 1997), po potpunom slučajnom blok sistemu u četiri ponavljanja. Veličina elementarne parcele bila je 25 m² (90-100 biljaka u redu).

Ispitivani preparati su primenjeni dva puta – na početku cvetanja (BBCH 61) (Meier, 1997) i pred početak zrenja (BBCH 65), pomoću ledne prskalice Solo 425 uz utrošak 1000 l/ha. Planirani tretman u punom cvetanju maline nije izveden zbog nepovoljnih vremenskih uslova (podaci nisu prikazani). Kontrolu su predstavljale netretirane biljke. Ispitivani preparati i koncentracije primene prikazane su u tabeli 1, a vreme tretiranja i ocene oglada u tabeli 2.

Efikasnost ispitivanih fungicida ocenjena je na osnovu izračunatog indeksa oboljenja zaraženih plodova, ubranih 20 do 30 dana nakon poslednjeg tretmana. Sto zrelih, slučajno odabranih plodova ubrano je sa biljaka iz središnjeg dela svake elementarne parcele, upakovano u plastične kutije (15x10x9 cm) i inkubirano dva dana na temperaturi od 7°C. Plodovi su razvrstani prema skali: **0** = nema simptoma, zdrav plod; **1** = trulež je zahvatila jednu koštunicu; **2** = trulež je zahvatila do 1/3 ploda; **3** = trulež je zahvatila preko 1/3 ploda.

Intenzitet oboljenja je izračunat po Townsend-Heuberger-ovoj formuli (Golenia, 1972), efikasnost po Abbott-u, a za obradu rezultata korišćene su standardne statističke metode, analiza varijanse i Duncan-ov test.

Radi ispitivanja osetljivosti na fungicide *in vitro*, izvršena je izolacija po 20 izolata sa kontrolnih parcela. Izvornu populaciju činilo je 30 izolata iz zasada iz Valjeva koji nikada nije tretiran nijednim pesticidom.

Izolacija patogena

Patogen je izolovan po metodi Locher i Lorenz (1991). Oboleli plodovi maline su inkubirani u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi kako bi se izazvao porast micelije i sporulacija patogena. Zatim su, pod stereo-mikroskopom, ste-

Tabela 1. Pregled fungicida korišćenih u ogledima

Aktivna materija	Preparat	Sadržaj aktivne materije	Proizvođač	Konc./doza primene preparata
Vinklozolin	Ronilan WG	500 g/kg	BASF	1 l/ha
Pirimetanil	Mithos SC	300 g/l	Bayer CropScience	2,5 l/ha
Benomil	Benfungin WP	500 g/kg	Galenika-Fitofarmacija	0,06%
Fenheksamid	Teldor SC	500 g/l	Bayer CropScience	0,1%

Tabela 2. Pregled vremena tretiranja fungicidima i ocene efikasnosti u polju

Tretiranje i ocena	Datum (i BBCH* fenofaza)	
	Požega	Šabac
T1	31. maj (61)	23. maj (61)
T2	14. jun (65)	31. maj (65)
Uzorkovanje za ocenu	06. jul (89)	13. jul (89)
Ocena	8. jul	15. jul

*(Meier, 1997)

rilnom laboratorijskom iglom izdvajane pojedinačne konidiofore sa konidijama i nanošene na krompir-dekstrozni agar (200 g krompir, 20 g dekstroza, 17 g agar, 1 l destilovana voda – KDA) (Muntanjola-Cvetković, 1987). Nakon inkubacije od dva dana na temperaturi od 20°C, dobijena micelija je presejana sa ciljem dobijanja čiste kulture.

Čiste kulture su prečišćene do monosporijalnih izolata koji su označeni kombinacijom slova i brojeva pri čemu slova predstavljaju lokalitete sa kojih potiču (Po – Požega, S – Šabac), osim populacije iz zasada koji nikad nije tretiran pesticidima, koja ima oznaku BCW i predstavlja izvornu populaciju *B. cinerea* za ispitivanje osetljivosti izolata na fungicide.

Održavanje izolata

Dobijene čiste kulture su zasejavane na zakošenu KDA podlogu i, nakon razvoja od tri dana na temperaturi od 20°C, čuvane u frižideru na temperaturi od 4°C (Dhingra i Sinclair, 1995).

Identifikacija patogena

Izolati su identifikovani na osnovu morfoloških karakteristika kolonija, konidiofora i konidija i poređenjem sa literaturnim podacima.

Kvalitativno proučavanje osetljivosti izolata

Za fungicide za koje je utvrđena niža efikasnost od očekivane u ogledima u polju urađen je kvalitativni test osetljivosti izolata *in vitro*. Osetljivost izolata *B. cinerea* na benomil i vinklozolin ispitana je na osnovu rasta micelije na KDA podlozi u koju su dodavani fungicidi u koncentraciji od 1, 5 i 10 mg/l po metodi koju su opisali Locher i Lorenz (1991), Stehmann (1995) i Leroux (2004). Fungicidi su prvo dispergovani u sterilnoj destilovanoj vodi, a zatim, uz neprestano mešanje na magnetnoj mešalici, aseptično dodavani u rastoplenu KDA podlogu prethodno ohlađenu do 50°C. Odnos mešanja disperzije fungicida i podloge je bio 1:9. U KDA podlogu u kontroli dodavana je sterilna destilovana voda. Za zasejavanje su korišćeni fragmenti micelije prečnika 10 mm iz kulture stare četiri dana. Praćen je početak rasta izolata na podlozi sa fungicidom posle 48 sati od zasejavanja na temperaturi od 20°C. Ogled je izveden u četiri ponavljanja po tretmanu i ponovljen dva puta.

Izolati su označeni kao osetljivi ako nisu rasli na podlozi koja sadrži 1 mg/l fungicida, slaborezistentni ako nisu rasli na 5 mg/l, srednjerezistentni ako nisu rasli na 10 mg/l, a visokorezistentni ako su rasli na podlozi koja sadrži 10 mg/l fungicida. Navedeni kriterijum za razvrstavanje je napravljen za potrebe ovog eksperimenta.

Određivanje izvorne osetljivosti *B. cinerea* na vinklozolin

S obzirom da je rezistentnost na benomil posledica povećane učestalosti visokorezistentnih sojeva, kvalitativni test osetljivosti pruža dovoljno informacija o stanju osetljivosti populacije patogena. Rezistentnost na dikarboksimide je, međutim, uglavnom posledica povećanja učestalosti umerenorezistentnih sojeva, tako da je za potpun uvid u stanje osetljivosti populacije neophodno uraditi kvantitativni test osetljivosti i rezultate uporediti sa izvornom osetljivošću.

Parametri osetljivosti pojedinačnih monosporijalnih izolata na vinklozolin ocenjeni su po delimično modifikovanoj metodi Leroux i Gredt (1972). Micelija izolata starosti četiri dana zasejavana je na KDA podlogu koja sadrži različite koncentracije fungicida i inkubirana na temperaturi od 20°C. Preliminarnim ispitivanjem su pronalazene koncentracije fungicida kojima se postiže inhibicija porasta izolata između 5% i 95% u odnosu na kontrolu. Za određivanje parametara osetljivosti korišćena je skala sa simetrično raspoređenim koncentracijama u utvrđenom opsegu, kako bi se dobila što pouzdanija vrednost parametra EC-50 (Robertson i sar., 1984). Fungicid je prvo dispergovan u sterilnoj destilovanoj vodi, a zatim aseptično dodavan u rastoplenu KDA podlogu temperature 50°C do finalne koncentracije od: 0,03; 0,06; 0,125; 0,25 i 0,5 mg/l. Odnos mešanja disperzije fungicida i podloge je bio 1:9. U hranljivu podlogu u kontroli dodavana je sterilna destilovana voda, tako da je efekat rastvarača i ostalih sastojaka u formulaciji pesticida zanemarivan. Svi testovi su izvedeni u tri ponavljanja. Nakon inkubacije od tri dana meren je prečnik kolonije u dva pravca pod pravim uglom. Za probit analizu su uzimani odgovori na najmanje četiri koncentracije, preračunati na procenat inhibicije u odnosu na kontrolu. Izračunate su koncentracije koje inhibiraju porast micelije 50% u odnosu na kontrolu (vrednost EC-50) i nagib regresione linije (b) (Finney, 1964).

REZULTATI

Efikasnost fungicida

Rezultati ispitivanja biološke efikasnosti fungicida u polju prikazani su u tabelama 3 i 4. Najveća efikasnost na oba lokaliteta postignuta je primenom fenheksamida i pirimetanila, dok je efikasnost vinklozolina i benomila bila statistički značajno niža.

Tabela 3. Indeks oboljenja plodova maline i efikasnost zaštite od *B. cinerea* na lokalitetu Požega

Fungicidi	Indeks oboljenja ^{1,2}	Efikasnost (%)
Vinklozolin	0,64±0,17 b	63,4
Pirimetamil	0,22±0,08 a	87,4
Benomil	0,65±0,14 b	63,3
Fenheksamid	0,18±0,04 a	89,6
Kontrola	1,76±0,29 c	-

¹ Srednja vrednost indeksa oboljenja izračunata na osnovu ocene 400 plodova;

² Ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna.

Tabela 4. Indeks oboljenja plodova maline i efikasnost zaštite od *B. cinerea* na lokalitetu Šabac

Fungicidi	Indeks oboljenja ^{1,2}	Efikasnost (%)
Vinklozolin	0,56±0,20 b	48,7
Pirimetamil	0,29±0,11 a	73,2
Benomil	0,36±0,11 ab	67,3
Fenheksamid	0,23±0,21 a	78,7
Kontrola	1,09±0,10 c	-

¹ Srednja vrednost indeksa oboljenja izračunata na osnovu ocene 400 plodova;

² Ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna.

Izolati

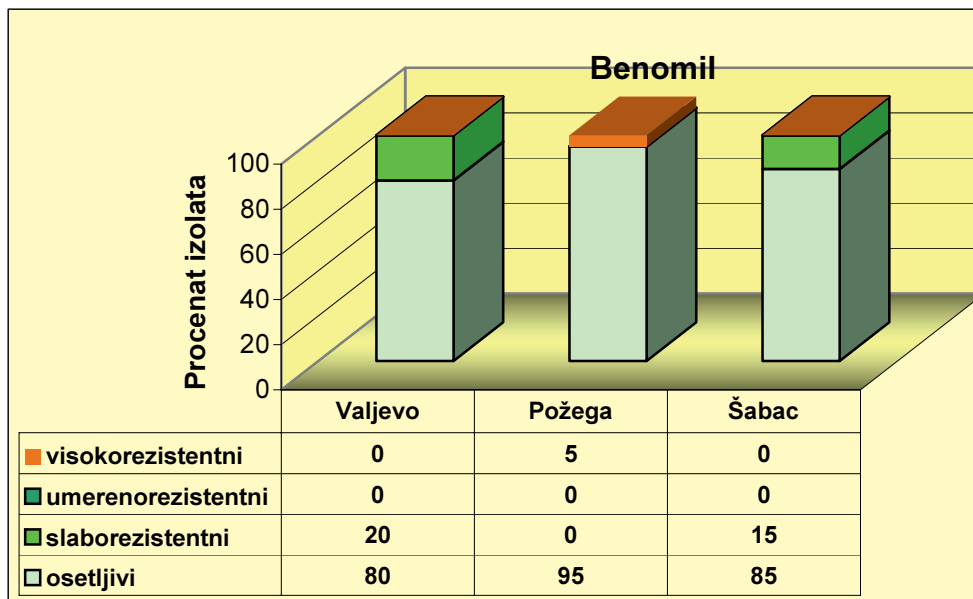
Iz obolelih plodova opisanim postupkom dobijeno je 70 izolata (po 20 iz Šapca i Požege i 30 iz izvorne populacije) koji na KDA podlozi formiraju belu, uniformnu,

rastresitu miceliju ravnog oboda koja petri-posudu prečnika 90 mm ispunjava za četiri dana na temperaturi od 20°C. Hife su septirane, hijalinske i razgranate, sa često prisutnim anastomozama. Većina izolata nije sporulisala ili je sporulacija bila veoma slaba i zapažena je nakon šest do sedam dana razvoja. Konidiofore su duge, smeđe, pri vrhu razgranate, tako da su konidije grupisane u grozdove (karakteristično grananje tipa botrytis). Na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika izolata i poređenjem sa literaturnim podacima, utvrđeno je da izolati pripadaju vrsti *Botrytis cinerea*.

Kvalitativni test osetljivosti izolata

Vinklozolin. Svi ispitivani izolati su ispoljili visok nivo osetljivosti na vinklozolin tako da prisustvo rezistentnih izolata nije zabeleženo, odnosno nijedan od 70 ispitivanih izolata nije uspeo da ostvari porast na podlozi koja sadrži 1 mg/l vinklozolina.

Benomil. Rezultati kvalitativnog testa osetljivosti na benomil prikazani su na slici 1. Od 70 ispitanih, 60 izolata pripada kategoriji osetljivih, dok su izolati različitog nivoa rezistentnosti pronađeni u svim ispitivanim populacijama, uključujući i izvornu. U populaciji sa lokaliteta Požega pronađen je jedan izolat visoke rezistentnosti na benomil, dok su rezistentni izolati iz izvorne populacije i populacije iz Šapca pripadali kategoriji slaborezistentnih.



Slika 1. Osetljivost izolata *Botrytis cinerea* na benomil

Kvalitativni test osetljivosti izolata na vinklozolin

Izorna osetljivost. Rezultati kvantitativnog testa osetljivosti izvorne populacije *B. cinerea* na vinklozolin prikazani su u tabeli 5.

Tabela 5. Parametri osetljivosti izvorne populacije *B. cinerea* na vinklozolin

Izolat	EC-50 (mg/l)	b*
BCW1	0,14 (0,07-0,34)	2,09±0,17
BCW2	0,15 (0,13-0,18)	2,51±0,24
BCW3	0,18 (0,16-0,20)	3,06±0,27
BCW4	0,15 (0,11-0,19)	1,86±0,32
BCW5	0,18 (0,15-0,22)	2,02±0,22
BCW6	0,14 (0,13-0,16)	2,61±0,24
BCW7	0,19 (0,17-0,22)	2,48±0,23
BCW8	0,24 (0,21-0,26)	3,38±0,36
BCW9	0,16 (0,14-0,18)	2,34±0,22
BCW10	0,14 (0,11-0,16)	1,81±0,21
BCW11	0,14 (0,12-0,16)	2,33±0,22
BCW12	0,14 (0,11-0,18)	1,81±0,21
BCW13	0,18 (0,16-0,23)	2,21±0,22
BCW14	0,26 (0,20-0,38)	1,83±0,33
BCW15	0,30 (0,27-0,32)	4,95±0,46
BCW16	0,18 (0,15-0,20)	3,31±0,38
BCW17	0,18 (0,16-0,22)	1,98±0,21
BCW18	0,20 (0,17-0,22)	2,45±0,23
BCW19	0,17 (0,15-0,19)	2,64±0,23
BCW20	0,16 (0,14-0,19)	2,10±0,21
BCW21	0,13 (0,08-0,24)	2,70±0,18
BCW22	0,16 (0,14-0,19)	2,04±0,21
BCW23	0,16 (0,14-0,18)	2,30±0,22
BCW24	0,17 (0,15-0,19)	3,28±0,28
BCW25	0,15 (0,10-0,23)	2,57±0,19
BCW26	0,14 (0,11-0,16)	1,68±0,20
BCW27	0,16 (0,12-0,24)	2,44±0,18
BCW28	0,29 (0,26-0,33)	3,21±0,35
BCW29	0,13 (0,11-0,15)	2,97±0,21
BCW30	0,17 (0,15-0,19)	3,74±0,39

* nagib regresione linije

Najniža EC-50 vrednost od 0,13 mg/l zabeležena je za izolate BCW29 i BCW21. Izolat BCW15 je ispoljio najmanju osetljivost na vinklozolin; EC-50 vrednost za ovaj izolat je iznosila 0,30 mg/l.

Osetljivost izolata iz Šapca i Požege. Rezultati ispitivanja biološke efikasnosti vinklozolina u komercijalnim zasadima u Šapcu i Požezi pokazali su nedovoljnu efikasnost ovog fungicida (Tabele 3 i 4). S obzirom da je rašireno mišljenje da je rezistentnost na dikarboksimide posledica pojave umerenorezistentnih sojeva u

populacijama patogena, urađen je kvantitativni test osetljivosti na vinklozolin izolata dobijenih iz kontrolnih parcela oglada u Šapcu i Požezi 2005. godine (izolati Po1-20 i S1-20) i upoređen sa osetljivošću izvorne populacije *B. cinerea*.

Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata iz Šapca na vinklozolin prikazani su u tabeli 6. Najosetljiviji bio je izolat S8 sa EC-50 vrednošću od 0,08 mg/l, dok je najmanje osetljiv bio izolat S2; EC-50 vrednost je bila 0,20 mg/l.

Tabela 6. Parametri osetljivosti izolata *B. cinerea* iz Šapca na vinklozolin

Izolat	EC-50 (mg/l)	b*
S1	0,11 (0,10-0,12)	4,32±0,40
S2	0,20 (0,18-0,23)	3,04±0,35
S3	0,11 (0,09-0,12)	2,46±0,32
S4	0,13 (0,10-0,15)	2,40±0,23
S5	0,11 (0,09-0,13)	2,3±0,22
S6	0,09 (0,07-0,10)	2,48±0,33
S7	0,11 (0,10-0,13)	2,89±0,33
S8	0,08 (0,07-0,10)	2,49±0,33
S9	0,12 (0,11-0,14)	3,24±0,34
S10	0,10 (0,09-0,12)	2,46±0,32
S11	0,14 (0,13-0,16)	3,17±0,35
S12	0,11 (0,10-0,13)	2,16±0,31
S13	0,14 (0,13-0,15)	3,82±0,38
S14	0,16 (0,13-0,18)	2,47±0,24
S15	0,14 (0,12-0,16)	3,11±0,27
S16	0,10 (0,09-0,12)	3,14±0,34
S17	0,12 (0,11-0,14)	3,50±0,36
S18	0,16 (0,14-0,19)	2,65±0,33
S19	0,13 (0,12-0,15)	3,18±0,34
S20	0,10 (0,08-0,13)	1,54±0,30

*nagib regresione linije

S obzirom da je za najmanje osetljiv izolat iz izvorne populacije (BCW15) EC-50 vrednost bila 0,30 mg/l, konstatujemo da je raspon osetljivosti populacije iz Šapca u granicama izvorne osetljivosti na vinklozolin tako da nedovoljna efikasnost suzbijanja *B. cinerea* na lokalitetu Šabac nije posledica smanjene osetljivosti populacije patogena.

Od izolata iz Požege, najveću osetljivost na vinklozolin ispoljio je izolat Po18 sa EC-50 vrednošću od 0,05 mg/l. Najmanje osetljiv bio je izolat Po14. Vrednost EC-50 za ovaj izolat iznosila je 0,25 mg/l (Tabela 7).

Raspon osetljivosti izolata iz ove populacije bio je u granicama osetljivosti izvorne populacije *B. cinerea* tako da nezadovoljavajuća efikasnost suzbijanja *B. cinerea* na lokalitetu Požege nije posledica smanjene osetljivosti populacije patogena.

Tabela 7. Parametri osetljivosti izolata *B. cinerea* iz Požege na vinklozolin

Izolat	EC-50 (mg/l)	b*
Po1	0,12 (0,09-0,15)	1,72±0,21
Po2	0,23 (0,21-0,26)	3,04±0,34
Po3	0,11 (0,08-0,14)	1,61±0,21
Po4	0,13 (0,10-0,15)	1,69±0,20
Po5	0,08 (0,06-0,10)	1,72±0,22
Po6	0,14 (0,12-0,17)	2,00±0,31
Po7	0,20 (0,17-0,24)	2,42±0,33
Po8	0,14 (0,12-0,16)	2,09±0,22
Po9	0,14 (0,11-0,17)	2,02±0,22
Po10	0,16 (0,14-0,19)	2,51±0,24
Po11	0,12 (0,09-0,16)	1,44±0,20
Po12	0,13 (0,11-0,15)	2,31±0,22
Po13	0,07 (0,05-0,09)	1,31±0,20
Po14	0,25 (0,22-0,29)	2,62±0,27
Po15	0,15(no)	no
Po16	0,17 (0,15-0,19)	4,58±0,48
Po17	0,16 (0,14-0,19)	2,94±0,27
Po18	0,05 (0,03-0,07)	1,46±0,23
Po19	0,11 (0,09-0,12)	2,08±0,23
Po20	0,12 (0,11-0,14)	2,33±0,23

*nagib regresione linije; no – nije određeno zbog konstantne heterogenosti podataka

DISKUSIJA

Ispitivanja biološke efikasnosti fungicida pokazala su konstantno visoku efikasnost pirimetanila i fenheksamida. Efikasnost fenheksamida bila je u intervalu od 78,7% do 89,6%, a pirimetanila od 68,8% do 98,2%. Razlika u efikasnosti ovih fungicida nije bila statistički značajna. Visoka efikasnost fenheksamida u zaštiti maline od *B. cinerea* utvrđena je u Velikoj Britaniji (Adam i Birch, 1998). Pokazano je da se fenheksamid čvrsto vezuje za epikutikularni vosak tako da je spiranje teško čak i pri jakim pljuskovima, što mu omogućuje produženo delovanje (Duben i sar., 2002). Dugotrajno delovanje fenheksamida primećeno je u zaštiti kruške (Errampalli i sar., 2007) i vinove loze (Harms i sar., 2007). Oba fungicida, pirimetanil i fenheksamid, ispoljili su vrlo visoku efikasnost suzbijanja *B. cinerea* u oglelima na vinovoj lozi (Zitter i Wilcox, 2007), krastavcu (Petsikos-Panayotarou i sar., 2003) i cvetovima *Leucospermum* sp., koja se gaji u Južnoj Africi kao ukrasna vrsta (Lubbe i Van den Berg, 2007), dok je visoka efikasnost pirimetanila zabeležena i u zasadu vreska (*Calluna vulgaris*) u Škotskoj (McQuilken i Thomson, 2008).

Efikasnost benomila na lokalitetu Šabac, mada prilično niska (67,3%), nije se razlikovala statistički značajno od efikasnosti fenheksamida i pirimetanila, dok je razlika u efikasnosti na lokalitetu Požege bila statistički značajna. Imajući u vidu da je na lokalitetu Požege pronađen jedan izolat visoke rezistentnosti na benomil, dalja istraživanja bi trebala da razjasne značajnost ovog nalaza.

Efikasnost vinklozolina (48,7-63,4%) bila je statistički značajno niža na oba lokaliteta u odnosu na ostale fungicide u oglelima. Radi potpunog uvida u stanje osetljivosti populacija *B. cinerea* na vinklozolin urađen je laboratorijski test osetljivosti izolata iz zasada u Požegi i Šapcu i dobijeni rezultati upoređeni sa osetljivošću izvorne populacije. Test osetljivosti *in vitro* nedvosmisleno je pokazao da slabija efikasnost vinklozolina u poređenju sa ostalim fungicidima korišćenim u eksperimentu nije posledica razvoja rezistentnosti patogena na lokalitetima na kojima su izvedeni ogledi. Naime, osetljivost populacija patogena iz zasada u Požegi i Šapcu nije se razlikovala od izvorne populacije. Takođe, ako posmatramo nominalne vrednosti EC-50 dolazimo do zaključka da su svi izolati osetljivi na vinklozolin. Prema Choi-u i sar. (1997), granica osetljivosti na vinklozolin je EC-50 od 0,5 mg/l. Imajući u vidu nemogućnost izvođenja tretmana u fazi punog cvetanja maline zbog nepovoljnih vremenskih uslova, koji su bili izuzetno povoljni za ostvarenje infekcije, pretpostavlja se da je glavni razlog niske efikasnosti suviše dug period između dva tretiranja u kritičnoj fenofazi maline.

Naša ispitivanja biološke efikasnosti fungicida u komercijalnim zasadima maline, kao i kvalitativni test osetljivosti na fungicide, pokazuju da je u velikoj većini slučajeva populacija *B. cinerea* osetljiva na fungicide. Drugim rečima, u slučajevima umanjene efikasnosti fungicida razlog bi trebalo potražiti pre svega u vremenu i načinu primene fungicida. Mada se vinklozolin i benomil više ne koriste u zaštiti maline, rezultati ispitivanja osetljivosti na ove fungicide pokazuju da ne bi trebalo očekivati ni smanjenu osetljivost populacija na iprodion i tiofanat-metil koji su još uvek u upotrebi.

S obzirom da su i svi visokoefikasni botriticidni fungicidi umerenog do visokog rizika, neophodno je striktno primenjivati sve poznate mere antirezistentne strategije kako bi se očuvala efikasnost postojećih botriticida u što dužem periodu. Smatra se da će razvoj novih aktivnih materija biti prilično 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).

ZAHVALNICA

Ovaj rad je realizovan kao deo projekta III46008 – Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane, Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

LITERATURA

Adam, N.M. and Birch, P.A.: The development of fenhexamid 50WG for the control of *Botrytis cinerea* (grey mould) on soft, cane, and bush fruit crops in Great Britain. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference, Brighton, UK, 1998, pp. 849-856.

Bielenin, A.: Control of raspberry and blackcurrant diseases by Tolyfluanid. Acta Horticulturae, 585: 331-333, 2002.

Choi, G.J., Lee, H.J. and Cho, K.J.: Involvement of catalase and superoxide dismutase in resistance of *Botrytis cinerea* to dicarboximide fungicide Vinclozolin. Pesticide Biochemistry and Physiology, 59: 1-10, 1997.

Dekker, J.: Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. In: Modern Selective Fungicides – Properties, Applications, Mechanisms of Action. (Lyr H., ed.), Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany, 1995, pp. 23-38.

Dhingra, O.D. and Sinclair, J.B.: Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA, 1995.

Duben, J., Rosselenbroich, H.J. and Jenner, G.: Teldor® (Fenhexamid) – A new specific fungicide for the control of *Botrytis cinerea* and related pathogens on Rubus, Ribes and other crops. Acta Horticulturae, 585: 325-329, 2002.

Errampalli, D., Wainman, L. and Chu, C.L.: Evaluation of fludioxonil for the control of post-harvest gray mould and blue mould in pears in cold and controlled atmosphere storages. International Journal of Pest Management, 53: 101-109, 2007.

Finney, M.A.: Probit analysis – A statistical treatment of the sigmoid response curve. University Press, 2nd edition, Cambridge, UK, 1964.

Golenia, A.: Analiza matematyczna epidemii chorób roślin [Mathematical analysis of epidemics of plant diseases]. Post. Nauk Roln., 5: 109-120, 1972.

Harms, M., Erzgraber, K., Alexander, E. and Ipach, R.: Long lasting activity of different botryticides on grapes. Book of Abstracts of XIV International *Botrytis* Symposium, Cape Town, South Africa, 2007, p. 78.

Isbii, H.: Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. Japan Agricultural Research Quarterly, 40: 205-211, 2006.

Leroux, P. and Gredt, M.: Etude de l'action in – vitro des fongicides, methode de l'incorporation ou milieu. Laboratoire de Phytopharmacie – INRA, Versailles, 1-10, 1972.

Locher, F.J. and Lorenz, G.: Methods for monitoring the sensitivity of *Botrytis cinerea* to dicarboximide fungicides. In: FRAC Methods for Monitoring Fungicide Resistance, EPPO Bulletin, 21: 341-345, 1991.

Lubbe, K. and Van den Berg, G.: Evaluation of selected fungicides for the control of *Botrytis cinerea* on *Leucospermum* flowers. Book of Abstracts of XIV International *Botrytis* Symposium, Cape Town, South Africa, 2007, p. 81.

McQuilken, M.P. and Thomson, J.: Evaluation of anilino-pyrimidine and other fungicides for control of grey mould (*Botrytis cinerea*) in container-grown *Calluna vulgaris*. Pest Management Science, 64: 748-754, 2008.

Meier, U.: Entwicklungsstadien mono- und dikotyle Pflanz. BBCH-Monograph, Blackwell Wissenschaftsverlag Berlin, 1997.

Muntanjola-Cvetković, M.: Opšta mikologija. NIRO Književne novine, Beograd, 1987.

Nikolić, M. and Tanović, B.: Rubus and Ribes industry in Serbia as a production model for developing countries. Book of Abstracts X International *Rubus & Ribes* Symposium, Zlatibor, Serbia, 2011, p. 127.

OEPP/EPPO: Efficacy evaluation of fungicides - *Botrytis cinerea* on strawberries. In: EPPO Standards – Efficacy evaluation of plant protection products. Volume 2 – Fungicides & Bactericides. OEPP/EPPO, Paris, France, 1997, pp. 19-21.

Petsikos-Panayotarov, N., Markellou, E., Kalamarakis, A.E., Kyriakopoulou, D. and Malathrakis, N.E.: In vitro and in vivo activity of cyprodinil and pyrimethanil on *Botrytis cinerea* isolates resistant to other botryticides and selection for resistance to pyrimethanil in a greenhouse population in Greece. European Journal of Plant Pathology, 109: 173-182, 2003.

Robertson, J.L., Smith, K.L., Savin, N.E. and Lavigne, R.J.: Effects of dose selection and sample size on the rescission of lethal dose estimates in dose-mortality regression. Journal of Economic Entomology, 77: 833-837, 1984.

Russell, P.E.: Sensitivity Baselines in Fungicide Research and Management. FRAC Monograph No 3, Crop life international, Brussels, Belgium, 2004.

Stebmann, C.: Biological Activity of Triazole Fungicides Towards *Botrytis cinerea*, Ponsen & Looine. Wageningen, Netherlands, 1995, pp. 3-28.

Zitter, S.M. and Wilcox, W.F.: Physical modes of action of fungicides used for control of *Botrytis* bunch rot of grapes. Book of Abstracts of XIV International *Botrytis* Symposium, Cape Town, South Africa, 2007, p. 129.

Is Low Efficacy of Fungicides always a Consequence of Fungicide Resistance Development in Pathogen Populations?

SUMMARY

Efficacy of four fungicides with different modes of action (vinclozolin, pyrimethanil, benomyl and fenhexamid) in control of *B. cinerea* in raspberry, was investigated in the paper. The trials were conducted at two localities in commercial raspberry plantations. In the case of unsatisfactory fungicide efficacy, qualitative and/or quantitative test of the susceptibility of the isolates to particular fungicide was performed, to determine whether the low efficacy is a consequence of resistance development in the pathogen population. At both localities, pyrimethanil and fenhexamid demonstrated the highest efficacy (73.2-89.6%), while the efficacy of vinclozolin was statistically significantly lower (48.7-63.4%) at both localities. However, qualitative and quantitative test of susceptibility to vinclozolin showed that all the isolates were susceptible to vinclozolin and that the reason for unsatisfactory efficacy should be primarily sought in inadequate fungicide application.

Keywords: *B. cinerea*; Raspberry; Fungicide efficacy; Resistance; *In vitro* susceptibility