

# Suzbijanje *Botrytis cinerea* i problem rezistentnosti na fungicide

Brankica Tanović<sup>1</sup>, Jovana Hrustić<sup>1</sup>, Milica Mihajlović<sup>1</sup>, Mila Grahovac<sup>2</sup>,  
Goran Delibašić<sup>3</sup> i Petar Vukša<sup>3</sup>

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

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

<sup>3</sup>Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080 Beograd, Srbija

Primljen: 29. marta 2011.

Prihvaćen: 24. maja 2011.

## REZIME

*Botrytis cinerea*, prouzročivač sive truleži, značajno ugrožava proizvodnju voća, grožđa, povrća i ukrasnog bilja. Često izaziva bolesti biljaka gajenih u zaštićenom prostoru, kao i trulež plodova tokom skladištenja i transporta. Gljiva parazitira skoro sve delove biljke u svim fazama razvoja, a simptomi se najčešće opisuju kao siva trulež, siva plesan, palež, mrka trulež, a zapaženo je i poleganje klijanaca. U radu je dat pregled dosadašnjih saznanja o mogućnostima suzbijanja ovog nekrotrofnog patogena. Posebna pažnja je posvećena mehanizmu delovanja fungicida novije generacije kao i problemu rezistentnosti. Istaknuto je da se ograničenjem broja tretiranja u toku jedne vegetacije, izbegavanjem upotrebe samo jednog fungicida visokog rizika za razvoj rezistentnosti, odgovarajućom dozom i vremenom primene, upotrebom mešavina pesticida različitog mehanizma delovanja kao i alternativnom primenom pesticida iz različitih rezistentnih grupa omogućuje dugotrajno očuvanje efikasnosti pesticida.

**Ključne reči:** *B. cinerea*; suzbijanje; fungicide; rezistentnost

## UVOD

*Botrytis cinerea*, prouzročivač sive truleži, patogen je za 235 vrsta biljaka, koje se prostiru od hladnih zona Aljaske i Kanade do suptropskih oblasti. Značajno ugrožava proizvodnju voća, grožđa, povrća i ukrasnog bilja. Često izaziva bolesti biljaka gajenih u zaštićenom prostoru, kao i trulež plodova tokom skladištenja i transporta. Gljiva parazitira skoro sve delove biljke u svim fazama razvoja, a simptomi se najčešće opisuju kao

siva trulež, siva plesan, palež, mrka trulež, a zapaženo je i poleganje klijanaca (Verhoeff, 1970; Van der Vlugt-Bergmans, 1996; Charabany i Shtienberg, 1999; Gi-raud i sar., 1999; Tanović i sar., 2009a; 2009b).

Teško je sa sigurnošću proceniti kolike su štete koje uzrokuje *B. cinerea*. Zavisno od useva/zasada i vremenskih uslova, gubici prinosa mogu dostići 50%, mada i potpuno propadanje useva nije neuobičajeno. O ekonomskom značaju patogena najbolje govori 15-25 miliona dolara, koliko se u svetu godišnje utroši na fungicide za suzbijanje

*B. cinerea* (Elad i sar., 2004). Suzbijanje *B. cinerea* je veoma zahtevno, jer patogen može da napadne skoro sve delove biljke u svim fazama razvoja (Gullino, 1992). Javlja se kako na gajenim, tako i na korovskim biljkama, može da živi i kao saprotrof na biljnim ostacima i organskim materijama u zemljištu, tako da je inokulum u usevu uvek prisutan, odnosno da je njegovo formiranje, oslobađanje i rasejavanje proces koji je stalno u toku (Rotem i sar., 1978; Jarvis, 1980).

## SUZBIJANJE *Botrytis cinerea*

Uspeh zaštite useva/zasada, odnosno roda kao finalnog proizvoda, u velikoj meri zavisi od stepena poznavanja biologije patogena, epidemiologije bolesti i odnosa parazit-domaćin. Samo na osnovu dobrog poznavanja svih činilaca koji direktno ili indirektno utiču na razvoj oboljenja moguće je primeniti kompleks mera kojima se sprečavaju štete: izbegavanjem napada, kreiranjem uslova nepovoljnih za razvoj oboljenja, ili onemogućavanjem uspostavljanja odnosa patogen i domaćin. Primenjena adekvatnih agrotehničkih mera trebalo bi da omogućiti izbegavanje napada i stvaranje nepovoljnih uslova za razvoj oboljenja. Uspeh zaštite, međutim, u najvećoj meri zavisi od uspešnosti sprečavanja uspostavljanja odnosa parazit i domaćin (Russell, 2005), tako da se mere suzbijanja mogu podeliti u četiri osnovne grupe:

- stvaranje otpornih sorata;
- agrotehničke mere;
- hemijske mere;
- biološke mere.

### Stvaranje otpornih sorti

Major geni koji kontrolišu otpornost na *B. cinerea* nisu poznati. Sorte pokazuju različit stepen pasivne otpornosti uslovljene morfološkim i fiziološkim karakteristikama koje im omogućavaju izbegavanje jačeg napada. To se, pre svega, odnosi na debljinu kutikule, maljavost listova, brzinu zarastanja rana i ostale osobine zbog kojih je sprečeno duže zadržavanje vodenog filma na površini biljaka čime je infekcija je otežana. Poligensko nasleđivanje ovih osobina i izražena genetička varijabilnost vrste *B. cinerea* značajno otežavaju selekciju otpornih sorata.

### Agrotehničke mere

Istraživanja su pokazala da se agrotehničkim merama može smanjiti količina inokuluma i obezbediti mikroklimatski uslovi koji su povoljni za biljku,

a nepovoljni za patogena. Redovna berba, uklanjanje biljnih ostataka posle berbe, uklanjanje obolelih biljnih delova i izbegavanje nepotrebnog povređivanja biljaka pri redovnim agrotehničkim operacijama, kao i smanjenje gustine useva ili zasada, može značajno da smanji intenzitet oboljenja. Za sprečavanje širenja patogena preporučuje se i malčiranje, prskanje biljaka kalcijum-nitratom, dobra ventilacija zaštićenih prostora i mnoge druge mere koje sprečavaju ili odlažu razvoj oboljenja (Stehmann, 1995).

### Biološke mere

Biološko suzbijanje predstavlja poseban način zaštite useva od patogena koji se zasniva na upotrebi mikroorganizama umesto konvencionalnih fungicida, ili kao njihova dopuna, radi smanjenja količine primene hemijskih supstanci u poljoprivredi. Proučavanja mikroorganizama u zaštiti od *B. cinerea* počinju pedesetih godina prošlog veka upotrebom antagonističkih sojeva *Fusarium* spp. i *Penicillium claviforme* u zaštiti salate (Nethook, 1951; Wood, 1951). Većina rezultata koji se odnose na mogućnosti upotrebe gljiva, bakterija i kvasaca, međutim, potiče iz poslednjih dvadesetak godina. Mada je utvrđeno antagonističko delovanje *Aureobasidium* spp., *Bacillus subtilis* i *Gliocladium* spp. na *B. cinerea* (Stehmann, 1995), većina istraživanja se odnosi na mikoparazitne vrste roda *Trichoderma* sa kojim su postignuti najbolji rezultati (Elad i sar., 1993; Elad, 1994, 2000; Gupta i sar., 1999; Okigbo i Ikediugwu, 2000). Upotreba formulisanog preparata na bazi *T. harizianum* u kombinaciji sa fungicidima daje dobre rezultate (Elad, 1994). Zadovoljavajući rezultati postignuti su i primenom preparata na bazi *Pythium oligandrum* (Filajdić i sar., 2003), mikopatogene gljive koja parazitira 23 vrste fitopatogenih gljiva među kojima je i *B. cinerea* (Laing i Deacon, 1991). Međutim, proizvodnja i korišćenje biopreparata još uvek je suviše skupo da bi bilo ekonomski isplativo zbog znatno niže cene konvencionalnih fungicida (Elad, 1994; Elad i sar., 1994).

### Hemijsko suzbijanje

Hemijsko suzbijanje predstavlja najvažniji način zaštite useva i zasada od *B. cinerea*. Pouzdane metode prognoze pojave bolesti u zasadima za sada ne postoje, pa se zaštita zasniva na preventivnom prskanju nadzemnih delova biljke u najosetljivijim fenofazama (Leroux i sar., 2002).

## FUNGICIDI ZA SUZBIJANJE *B. cinerea* I PROBLEM REZISTENTNOSTI

U početnim fazama razvoja zaštite useva i zasada od *B. cinerea*, četrdesetih i pedesetih godina prošlog veka, primenjivani su fungicidi sa nespecifičnim preventivnim delovanjem (dihloran, dihloluanid, hlortalonil i tiram) koji, i pored visokih doza od 2000 do

3000 g/ha, nisu obezbedili odgovarajuću zaštitu od patogena sa visokim infekcionim potencijalom (Stehmann, 1995; Leroux, 2004). Od šezdesetih godina prošlog veka za suzbijanje *B. cinerea* koriste se fungicidi sa specifičnim mehanizmom delovanja. Godina uvođenja u primenu najvažnijih jedinjenja za zaštitu useva i zasada od *B. cinerea* prikazana je u tabeli 1 (Russell, 2005).

**Tabela 1.** Fungicidi za suzbijanje *B. Cinerea*, Russel (2005) i Leroux (2004)

Godina	Fungicid	Hemijska grupa	Tipična doza primene (g a.m./ha)
1942.	tiram	ditiokarbamati	2000
1952.	kaptan	ftalimidi	1500
1952.	folpet	ftalimidi	1500
1960.	dihloran	nitroanilini	1500
1964.	hlortalonil	ftalonitirili	750–1250
1964.	dihlolfuanid	sulfamidi	2000
1968.	benomil	benzimidazoli	250–1000
1974.	iprodition	dikarboksimidi	750
1975.	vinklozolin	dikarboksimidi	750
1976.	karbendazim	benzimidazoli	500
1976.	prosimidon	dikarboksimidi	750
1990.	fludioxonil	fenilpiroli	500
1992.	pirimetanil	anilinopirimidini	800
1992.	fluzinam	dinitroanilini	750
1994.	ciprodinil	anilinopirimidini	375
1998.	fenheksamid	hidroksianilidi	750

Na osnovu biohemijskog mehanizma delovanja, botriticidi se mogu podeliti u pet grupa (Leroux i sar., 2002):

- 1) fungicidi koji remete disanje;
- 2) fungicidi koji remete funkciju mikrotubula;
- 3) fungicidi koji remete osmoregulaciju;
- 4) fungicidi koji remete sintezu metionina;
- 5) fungicidi koji remete sintezu sterola.

### Remećenje disanja

Razgradnja organskih molekula (ugljenih hidrata, lipida, proteina) obezbeđuje energiju za sve žive sisteme. U ćelijama gljiva, kao i kod svih ostalih eukariota, ovaj katabolički proces se završava u mitohondrijama gde dolazi do sinteze visokoenergetskog intermedijera poznatog pod nazivom adenzinotriofosfat (ATP). Nekoliko grupa fungicida narušava proces snabdevanja energijom ćelija *B. cinerea* (Leroux i sar., 2002):

- a) fungicidi nespecifičnog mehanizma delovanja (*multi-site toxicants*);
- b) inhibitori oksidativne fosforilacije;
- c) inhibitori mitohondrijalnog kompleksa III;
- d) inhibitori mitohondrijalnog kompleksa II.

### Fungicidi nespecifičnog mehanizma delovanja

Ovoj grupi pripadaju ditiokarbamati (tiram, mankozeb, maneb), ftalimidi (kaptan i folpet), arilsulfamidi (dihlolfuanid i tolfluanid) i hlortonitriili (hlortalonil). Ova jedinjenja deluju preventivno i zahtevaju učestaliju primenu i visoke doze, često i do 2000 g/ha (tabela 1). Uglavnom inhibiraju klijanje konidija, dok je njihov efekat na porast micelije *in vitro* značajno slabiji. Primarni mehanizam delovanja se zasniva na blokiranju enzima koji sadrže sumpor a učestvuju u klijanju konidija.

Smatra se da je rizik razvoja rezistentnosti na ovu grupu jedinjenja veoma nizak. Međutim, nekoliko slučajeva

izostanka efikasnosti suzbijanja *Botrytis* spp. alkilbisditiokarbamatima zabeleženo je u Evropi (Leroux, 2004). Pronađeni su sojevi *B. cinerea* rezistentni na kaptan (Pepin i MacPherson, 1982), a utvrđena je i ukrštena rezistentnost između kaptana, folpeta, kaptafola kao i ostalih fungicida sa sličnim mehanizmom delovanja – tirama i hlorotalonila (Barak i Edgington, 1984). U nekoliko evropskih zemalja otkrivena je i rezistentnost na dihofluanid (Malathrakis, 1989; Rewal i sar., 1991; Pollastro i sar., 1996), kao i hlorotalonil (Malathrakis, 1989). Kasnija istraživanja su pokazala da rezistentnost na dihofluanid kontrolišu najmanje dva gena – *Dic1* i *Dic2* (Pollastro i sar., 1996). Biohemijskim analizama je utvrđeno da je nivo glutaciona u ćelijama rezistentnih izolata izloženih delovanju kaptana znatno viši od normalnog. Pretpostavlja se da na taj način u ćeliji nastaju u višku jedinjenja koja sadrže sumpor a nisu neophodna za osnovno funkcionisanje ćelije, već služe za detoksikaciju fungicida i zaštitu tioproteina koji su neophodni za normalan metabolizam (Barak i Edgington, 1984). Međutim, veza između aktivnosti glutation S-transferaze, enzima koji katališe vezivanje glutaciona sa raznim toksikantima u ćeliji, i tolerantnosti na hemijski stres nije utvrđena (Prins i sar., 2000). Leroux (2004) smatra da ovaj proces nije razašnjen do kraja. Mada je rezistentnost na jedinjenja koja deluju na više mesta u ćeliji neočekivana (Gilpatrick i Blowers, 1974), objavljeni slučajevi rezistentnosti pokazuju da pod određenim uslovima, kao što je dugogodišnja primena istog fungicida, pogotovu u staklenicima, mogu dovesti do razvoja rezistentnosti čak i na fungicide sa nespecifičnim mehanizmom delovanja (Malathrakis, 1989).

### Inhibitori oksidativne fosforilacije

Najvažniji fungicid iz ove grupe je fluzinam sa širokim spektrom delovanja. U Japanu se koristi od 1990. godine za suzbijanje *B. cinerea* u različitim usevima. U Francuskoj je uveden u primenu 1999. godine. Fluzinam je visokotoksičan za spore i miceliju *B. cinerea*, a efekat se verovatno zasniva na inhibiciji oksidativne fosforilacije na membrani mitohondrija (Leroux i sar., 2002). Ukrštena rezistentnost sa drugim botriticidima nije utvrđena (Kalamarakis i sar., 2000) a monitoring rezistentnosti nije pokazao nikakve promene u osetljivosti populacije patogena u Francuskoj (Leroux i sar., 2002). Međutim, nedavna istraživanja u Japanu ukazuju na pojavu visokorezistentnih sojeva *B. cinerea* u usevima pasulja (Tamura, 2000). Biohemijska osnova rezistentnosti na fluzinam nije poznata. Pretpostavlja se da je u pitanju proces detoksikacije, a pretpostavka

je zasnovana na poznatom mehanizmu detoksikacije fluzinama u mitohondrijama ćelija sisara (Leroux i sar., 2002; Leroux, 2004).

### Inhibitori mitohondrijalnog kompleksa III

Fungicidi koji inhibiraju mitohondrijalno disanje vezivanjem za kompleks III (citohrom b) prvi put su se našli na tržištu 1996. godine. Većina fungicida ove grupe su sintetički analozi prirodnih strobilurina koje sintetišu neke vrste bazidiomiceta (Leroux i sar., 2002). Azoksistrobin i metaminostrobin su vrlo efikasni u suzbijanju *B. cinerea* u različitim usevima i zasadima (povrću, cveću, jagodama) (Dacol i sar., 1998). Međutim, u nekim slučajevima, pogotovu na vinovoj lozi, suzbijanje *B. cinerea* primenom strobilurina nije bilo zadovoljavajuće. Tamura i saradnici (1999) i Wood i Hollomon (2003) pretpostavljaju da je manja efikasnost posledica alternativnog disajnog puta u ćelijama *B. cinerea*. Naime, moguće je da elektronski fluks u mitohondrijama zaobolazi blokirani kompleks III zahvaljujući aktivnosti terminalnih alternativnih oksidaza, koje su i inače prisutne u mitohondrijama *B. cinerea* kao konstitutivni deo. U prilog ovoj pretpostavci ide i činjenica da je pokazano *in vitro* da se osetljivost na strobilurine značajno povećava kako inhibicijom alternativnih oksidaza, tako i razaranjem gena koji kodira njihovu produkciju (Tamura i sar., 1999). Stečena rezistentnost na strobilurine nastaje uglavnom kao posledica tačkaste mutacije na genu citohroma b na poziciji 143 koja dovodi do zamene glicina alaninom (Gisi i sar., 2002). Ostaje da se proverí da li je ovaj mehanizam značajan i za rezistentnost *B. cinerea* na strobilurine (Leroux, 2004).

### Inhibitori mitohondrijalnog kompleksa II

Karboksin i slični anilidi ili karboksamidi su sistemski fungicidi koji inhibiraju sukcinat dehidrogenazu uglavnom bazidiomiceta (Kulka i Von Schelming, 1995). Zapaženo je da neki karboksamidi deluju inhibitory i na *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Helminthosporium* spp. i *B. cinerea in vitro*. Selektivnost ove grupe fungicida zasniva se na razlici u osetljivosti enzima na delovanje fungicida i/ili na mogućnosti dospevanja fungicida do mesta delovanja (Leroux, 2004).

Boskalid je novi karboksamid širokog spektra delovanja koji efikasno suzbija *B. cinerea* u dozi od 600 g/ha. Monitoring rezistentnosti u vinogradima u Francuskoj pokazao je potpuno odsustvo rezistentnih sojeva. Utvrđeno je, takođe, da ne postoji ukrštena rezistentnost sa benzimidazolima, fenilkarbamatima i anilopirimidinima (Leroux, 2004).

## Remećenje funkcije mikrotubula

Benzimidazoli (karbendazim, benomil i tiofanat-metil) bili su prvi sistemski fungicidi sa širokim spektrom delovanja. Većina askomiceta, posebno *B. cinerea*, veoma je osetljiva na ova jedinjenja. Mehanizam delovanja se zasniva na sprečavanju sinteze mikrotubula specifičnim vezivanjem za tubulin, glavni gradivni element mikrotubula (Delp, 1995). U vinogradima u Francuskoj otkrivena su dva fenotipa rezistentnih sojeva. Prvi (Ben R1) ispoljava visok nivo rezistentnosti na benzimidazole (faktor rezistentnosti veći od 250) a osetljiviji je na dietofenkarb od sojeva normalne osetljivosti. Drugi (Ben R2) je umerenorezistentan na benzimidazole (faktor rezistentnosti 100-200) i dietofenkarb (Leroux i sar., 1999, 2002). Oba rezistentna fenotipa su rezultat mutacije na istom genu nazvanom *Mbc1* (Faretra i Pollastro, 1991, 1993). Utvrđeno je da je u Ben R1 sojevima na poziciji 198 glutamat zamenjen alaninom, a u Ben R2 sojevima na poziciji 200 fenilalanin je zamenjen tirozinom (Yarden i Katan, 1993). Dalja proučavanja genoma *B. cinerea* iz Izraela i Japana otkrila su još dve mutacije na kodonu 198 koji je izmenjen u kodon za valin ili lizin (Yarden i Katan, 1993; Nakazawa i Yamida, 1997). Sojevi kod kojih je utvrđen lizin umesto glutamata ispoljavaju visoku rezistentnost na benzimidazole i dietofenkarb (Yarden i Katan, 1993), dok su sojevi sa valinom umesto glutamata slaborezistentni na dietofenkarb (Nakazawa i Yamida, 1997). U laboratorijskim uslovima, mnogo mutacija na genu za  $\beta$ -tubulin ima za posledicu rezistentnost na benzimidazole. Međutim, u polju, kod većine patogenih mutacija su ograničene na pozicije 198 i 200 (Davidse i Ishii, 1995). Kao mogući razlog za odsustvo mutacija na drugim kodonima u poljskim uslovima Leroux (2004) navodi slabiju konkurentsku sposobnost mutanata u poređenju sa ostalim sojevima. Rezultati proučavanja u polju i staklenicima pokazuju da je rezistentnost na benzimidazole postojana u odsustvu tretiranja. Ovo zapažanje ukazuje da zamena glutamata alaninom ne utiče na konkurentsku sposobnost rezistentnih sojeva što i potvrđuju rezultati monitoringa Ben R1 sojeva u vinogradima u Francuskoj. Sa druge strane, učestalost Ben R2 sojeva u populaciji patogena u odsustvu tretiranja značajno se smanjuje ukazujući na negativan uticaj tirozina na poziciji 200 na konkurentsku sposobnost Ben R2 sojeva *B. cinerea* (Leroux, 2004).

## Remećenje osmoregulacije

Grupi fungicida koji remete osmoregulaciju pripadaju: dikarboksimid, fenilpiroli i aromatični ugljivodoni. Zajednička karakteristika cele grupe je međusobna

ukrštena rezistentnost, a laboratorijski mutanti različitih vrsta gljiva rezistentni na ove fungicide ispoljavaju izraženu osetljivost na povišen osmotski pritisak (Tanović, 2004a). Dikarboksimidu imaju cikličnu imidnu komponentu koja može da bude: oksazolidin-dion (vinklozolin i hlozolinat), sukcinimid (prosimidon i metomeklan) ili hidantoin (iprodion), zbog koje se razlikuje kako spektar delovanja, tako i nivo fungitoksičnosti ovih jedinjenja. Za celu grupu je karakteristična visoka efikasnost suzbijanja vrsta iz rodova *Botrytis*, *Monilinia* i *Sclerotinia*, kao i pojava ukrštene rezistentnosti, bez obzira kojim jedinjenjem je izazvana (Lorenz, 1988; Tanović i sar., 2002; Tanović, 2003, 2004b, 2007). Fenilpiroli (fenpiklonil i fludioksonil) su sintetički analozi pirolnitrina, antibiotskog jedinjenja koje stvaraju brojne vrste bakterija roda *Pseudomonas*. Razvijeni su kao efikasni fungicidi za zaštitu semena. Zbog izrazite fotostabilnosti fludioksonil je formulisan kao fungicid za suzbijanje *B. cinerea*. Aromatični ugljivodoni su stara grupa fungitoksikanata a najaktivniji među njima kao botriticid je dihloran (Leroux, 2004).

Cela grupa ovih jedinjenja izaziva slične nespecifične morfološke promene micelije slične promenama koje nastaju pod uticajem sorboze, citohalazina ili inhibitora sinteze proteina (Macris i Georgopoulos, 1973, loc. cit. Edlich i Lyr, 1995). Utvrđeno je da inhibiraju porast micelije i klijanje konidija, s tim što je inhibicija klijanja konidija slabije izražena (Parker i Fisher, 1979, loc. cit. Edlich i Lyr, 1995; Leroux, 2004). U tečnim kulturama, posle tretmana dikarboksimidima, dolazi do naduvavanja hifa, a veće koncentracije izazivaju rasprskavanje ćelija. Pod dejstvom subletalnih doza zapažaju se deformacije i nenormalno grananje hifa (Hisada i Kawase, 1977, loc. cit. Edlich i Lyr, 1995; Leroux, 2004).

Uprkos brojnim istraživanjima, primarni biohemijski mehanizam delovanja dikarboksimida nije poznat. Koncentracije fungicida koje izazivaju inhibiciju porasta micelije ne utiču na disanje, propustljivost membrana, sintezu sterola, proteina, nukleinskih kiselina i hitina (Pappas i Fisher, 1979). Postoje indirektni dokazi da je za fungitoksičnost dikarboksimida neophodna oksidativna bioaktivacija molekula (Gullino i Sisler, 1986). Edlich i Lyr (1987, loc. cit. Sisler, 1988) pretpostavljaju da dikarboksimidu blokiranjem NADP-citohrom C reduktaze izazivaju promene u transportu elektrona, što ima za posledicu povećanje koncentracije slobodnih kiseoničnih radikala, peroksidaciju lipida i druge nespecifične efekte koji narušavaju strukturu ćelijskih membrana. Choi i saradnici (1996), navode da narušavanje ćelijske strukture nastaje kao posledica peroksidacije lipida pri čemu plazmamembrana

nije primarno mesto delovanja vinklozolina. Edlich i Lyr (1995) smatraju da su unutrašnje membrane mitohondrija naročito osetljive na dikarboksimide zbog visokog sadržaja nezasićenih masnih kiselina.

Brojna istraživanja pokazuju da je umanjena efikasnost dikarboksimida posledica povećanja frekvencije umerenorezistentnih sojeva u populaciji patogena (Lorenz i Eichhorn, 1980; Murakoshi i Hosaya, 1982; Wang i sar., 1986; Elad i sar., 1992; Steel i Nair, 1993). Faretra i Pollastro (1991) su utvrdili da je rezistentnost na dikarboksimide determinisana jednim polimorfnim genom - *Daf1*.

### Remećenje sinteze metionina

Anilinopirimidini (pirimetanil, ciprodinil i melampirum) su fungicidi visoke efikasnosti u suzbijanju brojnih askomiceta (Tanović i sar., 2008a, 2008b). Na siromašnim hranljivim podlogama ova jedinjenja pri veoma malim koncentracijama snažno inhibiraju i klijanje konidija i rast micelije. Na kompleksnim podlogama bogatim hranljivim materijama, međutim, toksičnost je varijabilna jer su gljivi dostupna jedinjenja koja utiču na toksičnost anilinopirimidina (Leroux i sar., 1999; Leroux i sar., 2002). Eksperimentalno je pokazano da nekoliko aminokiselina, naročito metionin, poništava toksičnost anilinopirimidina (Masner i sar., 1994; Roslenbroich i Stuebler, 2000). Druga zajednička karakteristika svih anilinopirimidina je inhibicija sekrecije hidrolitičkih enzima patogenih gljiva (celulaza, kutinaza, lipaza, proteaza), neophodnih za ostvarenje infekcije. Tačan mehanizam uticaja anilinopirimidina na sintezu proteina nije poznat. Do sada su opisana tri fenotipa *B. cinerea* rezistentna na anilinopirimidine: Ani R1, Ani R2 i Ani R3. Genetička analiza je pokazala da je rezistentnost za svaki fenotip determinisana jednim major genom - *Ani1*, *Ani2* ili *Ani3* (Leroux i sar., 2002). Ani R1 sojevi, opisani u Francuskoj i drugim zemljama, su umereno- do visokorezistentni na anilinopirimidine a osetljivi na fungicide drugačijeg mehanizma delovanja (Leroux i sar., 1999). Ani R2 i Ani R3 ispoljavaju rezistentnost kako na anilinopirimidine, tako i na fungicide ostalih hemijskih grupa: dikarboksimide, fenilpirole, inhibitore sinteze sterola i cikloheksimide (Leroux i sar., 2002). Pretpostavlja se da je mehanizam rezistentnosti Ani R1 sojeva posledica promene mesta delovanja, nastala kao rezultat mutacije (Leroux, 2004). Postoje indicije da je rezistentnost na Ani R2 i Ani R3 sojeve rezultat pojačanog izbacivanja fungicida iz ćelije aktivnim transportom preko takozvanih ABC transportera (*ATP-binding cassette transporters*) (Leroux i

sar., 2002). Međutim, ni za jednu ni za drugu pretpostavku eksperimentalni dokazi još uvek ne postoje (Leroux i sar., 1999; Leroux, 2004).

### Remećenje sinteze sterola

Do sada su poznate četiri grupe inhibitora sinteze ergosterola:

- inhibitori skvalen epoksidacije;
- inhibitori 14 $\alpha$ -demetilacije;
- inhibitori sterol  $\Delta^{14}$  redukcije i/ili  $\Delta^8$ -  $\Delta^7$  izomerizacije;
- inhibitori C-4 demetilacije.

Inhibitori skvalen epoksidacije su značajni proizvodi u humanoj medicini. Kao pesticidi u poljoprivredi koriste se jedinjenja iz poslednje tri grupe, a nekoliko njih namenjeno je suzbijanju *B. cinerea*. Od inhibitora 14 $\alpha$ -demetilacije kao botriticidi mogu da se koriste prochloraz i tebukonazol. Međutim, male doze primene ovih fungicida (zbog fitotoksičnosti) nisu dovoljne za uspešnu zaštitu useva od *B. cinerea* (Leroux, 2004). Problem može biti prevaziđen jedino upotrebom ovih fungicida u smeši sa nekim od fungicida nespecifičnog mehanizma delovanja (Yunis i sar., 1991; Stehman, 1995): Najefikasniji inhibitor sinteze sterola u suzbijanju *B. cinerea* je hidroksianilid fenheksamid, inhibitor 3-keto reduktaze neophodne za C-4 demetilaciju u procesu sinteze ergosterola. Fenheksamid ima vrlo uzak spektar delovanja – efikasno suzbija *Botrytis* spp. i srodne vrste (*Sclerotinia* spp. i *Monillinia* spp.). Kao i ostali inhibitori sinteze ergosterola, fenheksamid ne utiče na klijanje konidija već u veoma malim koncentracijama snažno inhibira izduživanje inicijalnih hifa i porast micelije.

Sojevi *B. cinerea* Hyd R1, visokorezistentni na fenheksamid, lako su pronalazeni u populacijama patogena čak i pre uvođenja u primenu ovog fungicida. Međutim, rezistentnost se ispoljava samo u testu inhibicije porasta micelije *in vitro*, dok je proces izduživanje inicijalne hife osetljiv na hidroksianilide (Leroux i sar., 1999). Naime, utvrđeno je da ovi sojevi metabolišu fenheksamid, ali samo nakon dužeg perioda rasta u optimalnim laboratorijskim uslovima (Suty i sar., 1999). Zbog isključivo preventivne primene fenheksamida, Hyd R1 sojevi verovatno neće uticati na efikasnost suzbijanja u praktičnim uslovima, što je i pokazano u ogledima u polju (Suty i sar., 1999; Leroux i sar., 2002). Albertini i saradnici (2002), kao i Fournier i saradnici (2003; 2005) smatraju da su Hyd R1 sojevi *B. cinerea* izolovana genetička grupa. Sekvenciranje gena za 3-keto reduktazu (*ERG27*) i gena za 14 $\alpha$ -demetilazu (*Cyp51*) (Albertini i sar., 2002; Albertini i Leroux, 2004) potvrđuje genetičku razliku

između Hyd R1 i ostalih sojeva *B. cinerea* i ukazuje na opravdanost izdvajanja Grupe I (Leroux i sar., 2002). U Grupi II *B. cinerea* opisana su dva rezistentna fenotipa: Hyd R2 (umerene rezistentnosti na fenheksamid) i Hyd R3 (visokorezistentni na fenheksamid bez obzira da li je u pitanju izduživanje inicijalne hife ili porast micelije). Struktura gena *ERG27* Hyd R2 sojeva je vrlo slična strukturi osetljivih sojeva *B. cinerea*, dok su u Hyd R3 otkrivene dve mutacije odgovorne za zamenu fenilalanina izoleucinom na poziciji 412 i arginina u treonin na poziciji 496 3-keto reduktaze, što je verovatno dovelo do promene strukture primarnog mesta delovanja fenheksamida. Imajući u vidu ostale osobine Hyd R3 sojeva, potrebno je obratiti pažnju na njihovo prisustvo u populaciji patogena jer njihov udeo bi mogao uticati na razvoj rezistentnosti (Albertini i Leroux, 2004; Leroux, 2004). Kao pouzdan metod otkrivanja Hyd R3 sojeva, predlaže se test inhibicije porasta inicijalne hife pri koncentraciji fenheksamida većoj od 4 mg/L, a kao mera opreza preporučuje primena antirezistentne strategije (Couteux i Lejeone, 2003, loc. cit., Leroux, 2004).

## UPRAVLJANJE REZISTENTNOŠĆU

Rezistentnost predstavlja naslednu stečenu sposobnost individua u populaciji da prežive delovanje pesticida u koncentraciji u kojoj bi, pod normalnim uslovima, pesticid bio efikasan. Mada rezistentnost često može biti pokazana u laboratoriji, to još uvek ne znači da je efikasnost pesticida u polju smanjena. Za izostanak efikasnosti u praksi zbog promene osetljivosti populacije koristi se termin praktična rezistentnost (OEPP/EPPO, 1988).

Ako se ima u vidu da će primena fungicida verovatno ostati važan deo programa integralne zaštite bilja u budućnosti, proučavanje faktora koji utiču na pojavu rezistentnosti ima veliki značaj. Prema Georgopoulos-u (1988), na razvoj rezistentnosti utiču i aktivna materija i patogena vrsta. Brza pojava rezistentnosti najčešće nastaje upotrebom visokotoksičnog perzistentnog fungicida specifičnog mehanizma delovanja u suzbijanju patogena visokog infekcionog potencijala na osetljivom domaćinu gajenom na velikoj površini. Brent i Hollomon (1998) smatraju da upravo kombinacija fungicid specifičnog mehanizma delovanja i *Botrytis cinerea* nosi najveći rizik za razvoj rezistentnosti.

Kada se učestalost rezistentnih sojeva u populaciji patogena poveća toliko da se efikasnost fungicida značajno smanji, za upravljanje rezistentnošću je već kasno. S druge strane, nemoguće je unapred znati da li

će i kada učestalost rezistentnih sojeva preći prag tolerancije, pa je praćenje pojave rezistentnosti za sada jedini pouzdan način prikupljanja informacija neophodnih za pravilan izbor fungicida (Lorenz, 1988).

Izostanak efikasnosti pesticida zbog promene osetljivosti populacije štetnog organizama i razvoja praktične rezistentnosti, kao i neophodna uzastopna primena drugog proizvoda da bi se zaštitio usev, predstavlja gubitak kako za poljoprivrednog proizvođača, tako i za hemijsku kompaniju. Uz to, značajno je i zagađenje životne sredine koje bi se pravovremenom reakcijom moglo izbeći. Efikasno upravljanje rezistentnošću podrazumeva razumevanje faktora koji se odnose na izvor, razvoj i širenje. Rizik praktične rezistentnosti je rezultat kombinacije nasledenih faktora i faktora koji se odnose na uslove primene pesticida. Nasledeni faktori zavise od interakcije osobina štetnog organizma i osobina hemijske supstance i na njih se ne može uticati. Uslovi primene pesticida, međutim, pravilno definisani, mogu da budu značajan faktor smanjenja rizika. Iskustvo je pokazalo da, u slučajevima visokog rizika, primena efikasne antirezistentne strategije upravljanja rezistentnošću može da smanji rizik do prihvatljivog nivoa. Antirezistentna strategija se zasniva na pokušaju smanjenja selekcionog pritiska na ciljani organizam, čime se rezistentnost odlaže ili drži na niskom nivou. Ovo se postiže primenom takozvanih modifikatora rizika (*modifiers*) u svim slučajevima u kojima je rizik nastanka rezistentnosti suviše visok da bi bio prihvatljiv. Tako, ograničenje broja tretiranja u toku jedne vegetacije, izbegavanje upotrebe samo jednog fungicida visokog rizika, odgovarajuća doza i vreme primene, upotreba mešavina pesticida različitog mehanizma delovanja kao i alternativna primena pesticida iz različitih rezistentnih grupa omogućuje dugotrajno očuvanje efikasnosti pesticida (Brent i Hollomon, 1998; OEPP/EPPO, 2003).

## MONITORING REZISTENTNOSTI

Monitoring rezistentnosti, zajedno sa monitoringom efikasnosti fungicida, predstavlja okosnicu dobre antirezistentne strategije. Međutim, postavlja se pitanje kako prepoznati razvoj rezistentnosti, odnosno da li postoji način da se prati efikasnost pesticida pre nego što rezistentnost postane problem (Brent, 1988; Ma i Michailides, 2005). Russell (2004) smatra da je za odgovor na ovo pitanje neophodno poznavati reakciju izvorne populacije ciljanog organizma (*wild type population*) na fungicid, odnosno izvornu osetljivost (*baseline sensitivity*). Prema

definiciji, izvorna osetljivost nije jedan podatak, već serija podataka dobijena kao odgovor većeg broja individua (obično od 20 do 50) na delovanje pesticida i predstavlja raspon osetljivosti izvorne populacije koji služi kao etalon za praćenje pojave i razvoja rezistentnosti. Često se sreće pogrešno shvatanje da laboratorija može da preuzme već objavljene podatke neke druge laboratorije o izvornoj osetljivosti i da ih koristi kao etalon za svoja ispitivanja. Takva procedura može da bude veoma opasna i da dovede do pogrešnih zaključaka. Zbog razlika u interpretaciji procedura testiranja, različitih laboratorijskih uslova i načina ocene, čak i razlika u aktivnoj materiji ili preparatu, podaci dobijeni u jednoj laboratoriji mogu da odstupaju od literaturnih. Jedini način da se izbegne ovaj problem je određivanje izvorne osetljivosti u sopstvenoj laboratoriji (Russell, 2004).

Praćenje pojave rezistentnosti ima za cilj:

- utvrđivanje pravog uzroka sumnjivih slučajeva praktične rezistentnosti;
- predviđanje pojave problema rezistentnosti;
- provera adekvatnosti programa za upravljanje rezistentnošću;
- praćenje razvoja rezistentnosti;
- testiranje matematičkih modela za predviđanje rezistentnosti (Brent, 1988, 1995).

Osnovni, još uvek nerešen problem predstavlja broj i tip uzoraka neophodnih za dobijanje pouzdanih rezultata. Locher i Lorenz (1991) i Lorenz (1988) smatraju da su i broj i veličina uzorka određeni ciljem ispitivanja koji može biti: ispitivanje osetljivosti izvorne populacije (*wild tipe population*), ispitivanje nivoa rezistentnosti ili praćenje dinamike razvoja rezistentne populacije. Prema Brentu (1988), pored načina uzorkovanja, veličine, broja i distribucije uzoraka, važnu ulogu ima i odnos cene koštanja eksperimenta i vrednosti dobijenih podataka. Imajući u vidu sve elemente, najbolje je ispitivanja početi sa velikim uzorcima, a kasnija, detaljnija proučavanja izvesti na uzorcima manjeg obima. U oba slučaja, osetljivost sojeva bi trebalo ispitati brzo i uz minimalan broj presejavanja (Brent, 1988). Suty i saradnici (1999) su za potrebe praćenja osetljivosti na fenheksamid koristili izolate *B. cinerea* dobijene iz 20 do 30 pojedinačno upakovanih zaraženih plodova.

Locher i Lorenz (1991) navode nekoliko metoda za testiranje osetljivosti *B. cinerea* na dikarboksimide: preliminarni kvalitativni test, test inhibicije klijanja konidija i test inhibicije porasta micelije. Svaka od ovih metoda ima i prednosti i nedostatke, tako da izbor zavisi, pre svega, od cilja ispitivanja. Pošto metode nisu potpuno standardizovane, Brent (1988) sugeriše istraživačima da uz rezultate obavezno detaljno opišu i metodu, kako bi se izbegla pogrešna tumačenja.

Većina autora u ispitivanjima osetljivosti primenjuje metodu inhibicije porasta micelije (Farettra i Pollastro, 1991, 1993; Steel i Nair, 1993; Stehmann, 1995; Choi i sar., 1996, 1997; LaMondia i Douglas, 1997; Hayashi i sar., 2001; Tanović, 2010), mada se mogu zapaziti i radovi u kojima je primenjena metoda inhibicije klijanja konidija (Choi i sar., 1996) ili kvalitativni test (Berrie i Koomen, 1994; Stehmann i De Waard, 1996).

## 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

- Albertini, C., Thebaud, G., Fournier, E. and Leroux, P.:** Eburicol 14 $\alpha$ -demethylase gene (*CYP51*) polymorphism and speciation in *Botrytis cinerea*. Mycological Research, 106: 1171-1178, 2002.
- Albertini, C. and Leroux, P.:** A *Botrytis cinerea* putative 3-keto reductase gene (*ERG27*) that is homologous to the mammalian 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 7 gene (17 $\beta$ -HSD7). European Journal of Plant Pathology, 110: 723-733, 2004.
- Barak, E. and Edgington, L.V.:** Cross-resistance of *Botrytis cinerea* to captan, thiram, chlorothalonil, and related fungicides. Canadian Journal of Plant Pathology, 6: 318-320, 1984.
- Berrie, A.M. and Koomen, I.:** Benzimidazole and Dicarboximide Resistance in Pathogens of Stored Apples and Pears. In: Fungicide Resistance – BCPC Monograph 60 (Heaney S., Slawson D., Hollomon D.W., Smith M., Russel P.E., Parry D.W., eds.), The British Crop Protection Council, UK, 1994, pp. 207-217.
- Brent, K.J.:** Monitoring for Fungicide Resistance. In: Fungicide Resistance in North America. (Delp, C.J., ed.), The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 1988, pp. 9-11.
- Brent, K.J.:** Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can it Be Managed? FRAC Monograph No 1. Global Crop Protection Federation, Brussels, Belgium, 1995.
- Brent, K.J. and Hollomon, D.W.:** Fungicide Resistance: the Assessment of Risk. FRAC Monograph No 2. Global Crop Protection Federation, Brussels, Belgium, 1998, pp. 26-29.



- Charabany, G. and Shtienberg, D.:** Epidemiology of *Botrytis cinerea* in Sweet Basil and implications for disease management. *Plant Disease*, 83: 554-560, 1999.
- Choi, G.J., Lee, H.J. and Cho, K.J.:** Lipid Peroxidation and Membrane Disruption by Vinclozolin in Dicarboximide-Susceptible and-Resistant Isolates of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 55: 29-39, 1996.
- 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.
- Dacol, L., Gibbard, M., Hodson, M.O. and Knight, S.:** Azoxystrobin: development on horticultural crops in Europe. *Proceedings Brighton Crop Protection Conference*, Brighton, UK, 1998, pp. 843-848.
- Davidse, L.C. and Ishii, H.:** Biochemical and molecular aspects of the mechanisms of action of benzimidazoles, N-phenylformamidoximes and the mechanisms of resistance to these compounds in fungi. In: *Modern Selective Fungicides—Properties, Applications, Mechanisms of Action* (Lyr H., ed.), Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany, 1995, pp. 305-322.
- Delp, C.J.:** Benzimidazole and related fungicides. In: *Modern Selective Fungicides – Properties, Applications, Mechanisms of Action* (Lyr H., ed.), Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany, 1995, pp. 291-303.
- Edlich, W. and Lyr, H.:** Mechanism of action of dicarboximide fungicides. In: *Modern Selective Fungicides – Properties, Applications, Mechanisms of Action* (Lyr H., ed.), Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany, 1995, pp. 119-131.
- Elad, Y.:** Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum*. *Crop Protection*, 13: 35-38, 1994.
- Elad, Y.:** Biocontrol of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection*, 19: 709-714, 2000.
- Elad, Y., Yunis, H. and Katan, T.:** Multiple fungicide resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. *Plant Pathology*, 41: 41-46, 1992.
- Elad, Y., Zimand, G., Zaqs, Y., Zuriel, S. and Chet, I.:** Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathology*, 42: 324-332, 1993.
- Elad, Y., Köbl, J. and Fokkema, N.J.:** Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 100: 315-336, 1994.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N.:** *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems – an introduction. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 2004, pp. 1-8.
- Faretra, F. and Pollastro, S.:** Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research*, 95: 943-951, 1991.
- Faretra, F. and Pollastro, S.:** Genetics of sexual compatibility and resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) from nine countries. *Plant Pathology*, 41: 48-57, 1993.
- Filajdić, N., Vukša, P., Ivanović, M. i Rekanović, E.:** Biološke mere zaštite bilja: problemi i perspektive. *Pesticidi*, 18: 69-75, 2003.
- Fournier, E., Levis, C., Fortyni, D., Leroux, P., Giraud, T. and Brygoo, Y.:** Characterisation of *Bc-hcb*, the *Botrytis cinerea* homolog of *Neurospora crassa* *het-c* vegetative incompatibility locus and its use as a population marker. *Mycologia*, 95: 251-261, 2003.
- Fournier, E., Giraud, T. and Brygoo, Y.:** Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia*, 97: 1251-1267, 2005.
- Georgopoulos, S.G.:** Genetics and Population Dynamics. In: *Fungicide Resistance in North America* (Delp C.J., ed.), The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 1988, pp. 12-13.
- Gilpatrick, J.D. and Blowers, D.R.:** Ascospore tolerance to dodine in relation to orchard control of apple scab. *Phytopathology*, 64: 649-652, 1974.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., Lobuglio, K. and Brygoo, Y.:** Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuina*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology*, 89: 967-973, 1999.
- Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A. and McCaffery, A.:** Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides, *Pest Management Science*, 58: 859-867, 2002.
- Gullino, M.L.:** Chemical control of *Botrytis* spp. In: *Recent Advances in Botrytis Research* (Verhoeff K., Malathrakis N.E., Williamson B., eds.), Pudis Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands, 1992.
- Gullino, M.L. and Sisler, H.D.:** Antagonism of iprodione toxicity to *Botrytis cinerea* by mixed function oxidase inhibitors. *Pesticide Science*, 17: 143-149, 1986.
- Gupta, V.P., Tewari, S.K., Govindaiah D. and Bajpai, A.K.:** Ultrastructure of mycoparasitism of *Trichoderma*, *Gliocladium* and *Laetisaria* species on *Botryodiplodia theobromae*. *Journal of Phytopathology*, 147: 19-24, 1999.

- Hayashi, K., Schoonbeek, H., Sugiura, H. and De Waard, M.A.:** Multidrug resistance in *Botrytis cinerea* associated with decreased accumulation of the azole fungicide oxpocnazole and increased transcription of the ABC transporter Gene *BcatrD*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 70: 168-179, 2001.
- Jarvis, W.R.:** Epidemiology. In: The biology of *Botrytis* (Coley-Smith J.R., Verhoeff K., Jarvis W.R., eds.), Academic Press, London, UK, 1980, pp. 219-250.
- Kalamarakis, A.E., Petsikos-Paragiotarou, N., Mauroides, B. and Ziogas, B.N.:** Activity of fluzinam against strains of *Botrytis cinerea* resistant to benzimidazoles and/or dicarboximides and to benzimidazole-phenylcarbamate mixture. Journal of Phytopathology, 148: 449-455, 2000.
- Kulka, M. and Von Schmeling, B.:** Carboxin fungicides and related compounds. In: Modern Selective Fungicides (Lyr H., ed.), Gustav Fisher Verlag, Jena, Germany, 1995, pp. 133-147.
- LaMondia, J.A. and Douglas, S.M.:** Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut Greenhouses to Benzimidazole and Dicarboximide Fungicides. Plant Disease, 81: 729-732, 1997.
- Laing, S.A.K. and Deacon, J.W.:** Video microscopical comparison of mycoparasitism by *Pythium oligandrum*, *P. nunn* and unnamed *Pythium* species. Mycological Research, 95: 469-479, 1991.
- Leroux, P.:** Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 2004, pp. 195-222.
- Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D. and Gredt, M.:** Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. Crop Protection, 18: 687-697, 1999.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M. and Chapeland, F.:** Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. Pest Management Science, 58: 876-888, 2002.
- 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.
- Lorenz, G.:** Dicarboximide Fungicides: History of Resistance Development and Monitoring Methods. In: Fungicide Resistance in North America (Delp C.J., ed.), The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 1988, pp. 45-51.
- Lorenz, D.H. and Eichhorn, K.W.:** Vorkommen und Verbreitung der Resistenz von *Botrytis cinerea* gegen Dicarboximid-Fungizide im Anbaugebiet der Rheinpfalz. Die Wein-Wissenschaft, 35: 199-210, 1980.
- Ma, Z. and Michailides, T.J.:** Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. Crop Protection, 24: 853-863, 2005.
- Malathrakis, N.E.:** Resistance of *Botrytis cinerea* to Dichlofluanid in Greenhouse Vegetables. Plant Disease, 73: 138-141, 1989.
- Masner, P., Muster, P. and Schmid, J.:** Possible methionine biosynthesis inhibition by pyrimidinamine fungicides in *Botrytis cinerea*. Pesticide Science, 42: 163-166, 1994.
- Murakoshi, S. and Hosaya, S.:** Occurrence of *Botrytis cinerea* resistant to iprodione in tomato fields. Annals of Phytopathological Society of Japan, 48: 547-550, 1982.
- Nakazawa, Y. and Yamada, M.:** Chemical control of grey mould in Japan. A history of combating resistance. Agrochemicals Japan, 71: 2-6, 1997.
- Netbook, F.J.:** Microbial control of *Botrytis cinerea* Pers. II Antagonism by fungi and actinomycetes. Annals of Applied Biology, 35: 185-202, 1951.
- OEPP/EPPO:** Fungicide resistance: definitions and use of terms, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 18: 569-574, 1988.
- OEPP/EPPO:** Resistance risk analysis, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 33: 37-63, 2003.
- Okigbo, R.N. and Ikediugwu, F.E.O.:** Studies on biological control of postharvest rot in Yams (*Dioscorea* spp.) using *Trichoderma viridae*. Journal of Phytopathology, 148: 351-355, 2000.
- Pappas, A.C. and Fisher, D.J.:** A Comparison of the Mechanisms of Action of Vinclozolin, Procymidone, Iprodione and Prochloraz against *Botrytis cinerea*. Pesticide Science, 10: 239-246, 1979.
- Pepin, H.S. and MacPherson, E.A.:** Strains of *Botrytis cinerea* resistant to benomyl and captan in the fields. Plant Disease, 66: 404-405, 1982.
- Pollastro, S., Faretra, F., Di Canio, V. and De Guido, A.:** Characterization and genetic analysis of field isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to dichlofluanid. European Journal of Plant Pathology, 102: 607-613, 1966.
- Prins, T.W., Wagemakers, L., Schouten, A. and Van Kan, J.A.L.:** Cloning and characterisation of glutathione S-transferase homologue from the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Molecular Plant Pathology, 1: 169-178, 2000.
- Rewal, N., Coley-Smith, J.R. and Sealy-Lewis, H.M.:** Studies on resistance to dichlofluanid and other fungicides in *Botrytis cinerea*. Plant Pathology, 40: 554-560, 1991.

- Rosslenbroich, H.J. and Stuebler, D.:** *Botrytis cinerea* – history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, 19: 557-561, 2000.
- Rotem, J., Cohen, Y. and Bashi, E.:** Host and environmental influences on sporulation *in vivo*. *Annual Review of Phytopathology*, 16: 83-101, 1978.
- Russell, P.E.:** Sensitivity Baselines in Fungicide Research and Management. FRAC Monograph No 3, Crop life international, Brussels, Belgium, 2004.
- Russell, P.E.:** Centenary review - A century of fungicide evolution. *Journal of Agricultural Science*, 143: 11-25, 2005.
- Sisler, H.D.:** Dicarboximide fungicides: Mechanisms of action and resistance. In: *Fungicide Resistance in North America* (Delp C.J., ed.), The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 1988, pp. 52.
- Steel, C.C. and Nair, N.G.:** The Physiological Basis of Resistance to the Dicarboximide Fungicide Iprodione in *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 15: 222-233, 1993.
- Stebmann, C.:** Biological Activity of Triazole Fungicides Towards *Botrytis cinerea*, Ponsen & Looine. Wageningen, Netherlands, 1995, pp. 3-28.
- Stebman, C. and De Waard, M.A.:** Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* to triazoles, benomyl and vinclozolin. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 171-180, 1996.
- Suty, A., Pontzen R. and Stenzel, K.:** Fenhexamid – Sensitivity of *Botrytis cinerea*: Determination of baseline sensitivity and assessment of the risk of resistance. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 52: 145-157, 1999.
- Tamura, O.:** Resistance development of grey mould of beans towards fluzinam and relevant counter-measures. Book of Abstracts of 10<sup>th</sup> Symposium of Research Committee of Fungicide Resistance, Okoyama, Japan, 2000, pp. 7-16.
- Tamura, O., Mizutani, A., Yukioka, H., Miki, N., Ohba, K. and Masuko, M.:** Effect of the methoxyiminoacetamide fungicide, SSF 129, on respiratory activity in *Botrytis cinerea*. *Pesticide Science*, 55: 681-686, 1999.
- Tanović, B.:** Osetljivost izolata *Botrytis cinerea* Pers. iz različitih domaćina na dikarboksimide. *Pesticidi*, 18: 223-235, 2003.
- Tanović, B.:** Biološke karakteristike izolata *Botrytis cinerea* Pers. različite osetljivosti prema dikarboksimidima. Magistarska teza, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, 2004a.
- Tanović B.:** Dobijanje laboratorijskih sojeva *Botrytis cinerea* Pers. rezistentnih na dikarboksimide crossed-paper metodom. *Pesticidi i fitomedicina*, 19(1): 39-53, 2004b.
- Tanović, B.:** Biološke karakteristike izolata *Botrytis cinerea* Pers. različite osetljivosti na dikarboksimide. *Pesticidi i fitomedicina*, 22(2): 137-154, 2007.
- Tanović, B.:** Struktura populacije *Botrytis cinerea*, patogena maline, mogućnost suzbijanja i procena rizika razvoja rezistentnosti na fungicide. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, 2010.
- Tanović B., Stanisavljević B., Vračarević M., Potočnik I. i Todorović B.:** Osetljivost *Botrytis cinerea* Pers. na fungicide različitog mehanizma delovanja. Zbornik rezimea XII simpozijuma o zaštiti bilja i savetovanja o primeni pesticida, Zlatibor, 2002, str. 133.
- Tanović, B., Delibašić, G. i Hrustić, J.:** Biološke karakteristike izolata *Botrytis cinerea*, patogena kupine. Book of Abstracts VI Congress of Plant Protection with Symposium about Biological Control of Invasive Species, Zlatibor, Serbia, I, 2009a, pp. 73-74.
- Tanović, B., Delibašić, G., Milivojević, J. and Nikolić, M.:** Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from small fruits and grapevine in Serbia. *Archives of Biological Sciences*, 61(3): 419-429, 2009b.
- Tanović, B., Milivojević, J. and Nikolić, M.:** Biological and chemical control of *Botrytis cinerea* in strawberry cv. "Clery". Book of Abstracts of VI International Strawberry Symposium, Huelva, Spain, 2008a, p. 362.
- Tanović, B., Rekanović, E., Potočnik, I. and Todorović, B.:** Effectiveness of fungicides and biofungicides in the control of gray mould of raspberry in Serbia. Proceeding IX *Rubus* and *Ribes* Symposium, Pucon, Chile – *Acta horticulturae*, 777: 339-343, 2008b.
- Van der Vlugt-Bergmans, C.J.B.:** Genetic variation and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. Proefschrift Wageningen, Met lit. opg. Met samenvatting in het, Nederlands, 1996.
- Verhoeff K.:** Spotting of tomato fruits caused by *Botrytis cinerea*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 76: 219-226, 1970.
- Wang, Z.N., Coley-Smith, J.R. and Wareing, P.W.:** Dicarboximide resistance in protected lettuce. *Plant Pathology*, 35: 427-433, 1986.
- Wood, R.K.S.:** The control of diseases of lettuce by use of antagonistic microorganisms I. The control of *Botrytis cinerea* Pers. *Annals of Applied Biology*, 38: 203-216, 1951.
- Wood, P.M. and Hollomon, D.H.:** A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting Qo site of complex III. *Pest Management Science*, 59: 499-511, 2003.
- Yarden, O. and Katan, T.:** Mutation leading to substitutions at amino-acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 83: 1478-1483, 1993.
- Yunis, H., Elad, Y. and Mabrer, Y.:** Influence of fungicide control of cucumber and tomato grey mould (*Botrytis cinerea*) on fruit yield. *Pesticide Science*, 31: 325-335, 1991.

# *Botrytis cinerea* Control and the Problem of Fungicide Resistance

## SUMMARY

*Botrytis cinerea*, the causal agent of grey mould, greatly affects fruit, grapevine, vegetable and ornamental crops production. It is a common causal agent of diseases in plants grown in protected areas, as well as fruit decay during storage and transport. The fungus invades almost all parts of the plant in all developmental stages, and the symptoms are usually described as grey mould, grey mildew, brown rot and seedling blight. The paper reviews the current knowledge on control possibilities of this necrotrophic pathogen. The attention is particularly paid to the mode of action of novel fungicides and to the problem of resistance. It is pointed out that by limiting the number of treatments in the growing season, avoiding the use of only one fungicide with a high risk for resistance development, appropriate application rate and timing, using mixtures of pesticides with different modes of action, as well as by alternative use of pesticides from different resistance groups, a long-term preservation of pesticide efficacy is provided.

**Keywords:** *B. cinerea*; Control; Fungicides; Resistance