

Biološke karakteristike izolata *Botrytis cinerea* Pers. različite osetljivosti na dikarboksimide

Brankica Tanović

Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd, Srbija

REZIME

U radu su proučavane biološke karakteristike izolata *B. cinerea* različite osetljivosti na dikarboksimide. Utvrđeno je da se visokorezistentni izolati morfološki razlikuju od izolata normalne osetljivosti. Oni su uglavnom slabije patogeni i formiraju manji broj sklerocija od izolata normalne osetljivosti. Zabeležena je visoka negativna korelacija između osetljivosti na povećan osmotski pritisak i rezistentnosti na dikarboksimide, kao i brzine rasta izolata i rezistentnosti na dikarboksimide. Uticaj temperature, vrste i kiselosti hranljive podloge na porast micelije visoko rezistentnih izolata *B. cinerea* slabije je izražen u odnosu na porast osetljivih izolata.

Cljučne reči: *Botrytis cinerea*; dikarboksimidi; rezistentnost; osmoosetljivost; iprodion; vinklozolin

UVOD

Botrytis cinerea pripada rodu *Botrytis* (red *Moniliales*, familija *Botrytidaceae*) koji je prvi put opisan 1729. godine i jedan je od najstarijih rodova fitopatogenih gljiva (Jarvis, 1977; loc. cit. Van der Vlugt-Bergmans, 1996). *B. cinerea* je patogen za 235 vrsta biljaka, koje se prostiru od hladnih zona Aljaske i Kanade do suptropskih oblasti. Značajno ugrožava proizvodnju voća, vinove loze, povrća, ukrasnog bilja (Van der Vlugt-Bergmans, 1996). Čest je prouzrokovatelj bolesti biljaka gajenih u zaštićenom prostoru (Coley-Smith, 1980; loc. cit. Chardonnet i sar., 2000; Giraud i sar., 1999). Gljiva parazitira skoro sve delove biljke u svim fazama razvoja, kao i plodove tokom skladištenja. Simptomi se najčešće opisuju kao siva trulež, siva plesan, palež, mrka trulež, a zapaženo je i poleganje klijanaca. U završnoj fazi, oboleli biljni de-

lovi potpuno su prekriveni sivom navlakom reproduktivnih tvorevina parazita (Verhoeff, 1970; Ribereau-Gayon i sar., 1980, loc. cit. Van der Vlugt-Bergmans, 1996; Charabany i Shtienberg, 1999). Kao pleomorfna vrsta, *B. cinerea* stvara konidiofore i konidije, fialokonidiofore sa mikrokonidijama, sklerocije i apresorije.

B. cinerea je opisana kao visokovarijabilna vrsta. Razlike između izolata u pogledu brzine porasta, formiranja konidija i sklerocija, produkcije enzima i patogenosti, zabeležili su Grindle (1979), Di Lena i saradnici (1981), Leone (1990), Movahedi i Heale (1990) i drugi.

Za suzbijanje *B. cinerea* u početku su primenjivani fungicidi nespecifičnog preventivnog dejstva (dihloran, dihlouanid, hlortalonil i tiram) koji, i pored visokih doza, nisu obezbedili odgovarajuću zaštitu od patogena sa tako visokim infekcionim potencijalom (Stehmann,

1995). Od šezdesetih godina, za suzbijanje *B. cinerea* se koriste benzimidazoli, od sedamdesetih dikarboksimidi, a devedesetih anilinopirimidini i fenilpiroli (Knight i sar., 1997; Rosslenbroich i Stuebler, 2000).

Eksperimentalno je dokazano da je umanjena efikasnost dikarboksimida posledica povećanja učestalosti rezistentnih jedinki u populaciji patogena (Lorenz i Eichhorn, 1980; Murakoshi i Hosaya, 1982; Wang i sar., 1986; Elad i sar., 1992; Steel i Nair, 1993). U stranoj literaturi za ove jedinke, odnosno delove prirodnih populacija patogena koji ispoljavaju različitu osetljivost na fungicide, brojni autori koriste termin „strains” odnosno sojevi (Wang i sar., 1986; Elad i sar., 1992; Steel i Nair, 1993; Latorre i sar., 2002). S obzirom da se i u radovima koji se odnose na proučavanje rezistentnosti u laboratorijskim uslovima za rezistentne jedinke najčešće ravnopravno koriste dva termina – rezistentni izolati ili rezistentni sojevi (Elad i sar., 1992; Gouot, 1994; Lorenz, 1994; Stehmann, 1995; Latorre i sar., 2002), opredelili smo se da slično postupimo i u ovom radu. Kada se govori o delovima prirodnih populacija koji ispoljavaju različitu osetljivost na fungicide biće upotrebljavan termin osetljivi/rezistentni sojevi, dok će za jedinke u laboratorijskim uslovima biti ravnopravno upotrebljavan jedan od termina – sojevi ili izolati.

Prvi soj *B. cinerea* rezistentan na dikarboksimide pronađen je u vinogradu u Mosel-u 1978. godine, tri godine nakon registracije prvog fungicida iz ove hemijske grupe. Godinu dana kasnije, rezistentni sojevi su prisutni u vinogradarskim regionima zapadne Nemačke, Švajcarske, Italije, Novog Zelanda i Kanade (Lorenz, 1994; Raposo i sar., 2000).

Rezistentni sojevi su pronađeni i u populacijama *B. cinerea* na jagodi, povrtarskim vrstama i biljkama gajenim u zaštićenom prostoru (LaMondia i Douglas, 1997; Yourman i Jeffers, 1999; Yourman i sar., 2000), kao i na vinovoj lozi u Srbiji (Rajković, 1992). Ipak, trebalo bi napomenuti da Lorenz i Eichhorn (1978), Sprengler i saradnici (1979), kao ni Hisada i saradnici (1979) nisu uspjeli da izoluju rezistentne sojeve *B. cinerea* ni posle višegodišnje intenzivne primene dikarboksimida u polju. Svi izolati *B. cinerea* iz jagode, maline, vinove loze i salate poreklom sa različitih lokaliteta u Srbiji, izolovani tokom 2001. i 2002. godine bili su, takođe, osetljivi i na iprodion i na vinklozolin (Tanović, 2003).

Prema navodima mnogih autora nije teško dobiti laboratorijske sojeve gljiva rezistentne na dikarboksimide (Beever i Brien, 1983; Grindle, 1984; Littley i Rahe, 1984, loc. cit. Pommer i Lorenz, 1995; Tanović, 2004). Proučavanja većine autora su pokazala da sojevi gljiva,

rezistentni na dikarboksimide, sporije rastu na hranljivoj podlozi nego osetljivi sojevi (Hisada i sar., 1979; Davis i Dennis, 1981), posebno ako se uporede laboratorijski adaptirani sojevi sa prirodno osetljivim (Lorenz i Pommer, 1985, loc. cit. Pommer i Lorenz, 1995). Međutim, dobijeni su i sojevi *B. cinerea* rezistentni na dikarboksimide, čija micelija ne zaostaje u porastu za micelijom osetljivih sojeva (Pommer i Lorenz, 1995). Summers i saradnici (1984) navode da rezistentni sojevi *B. cinerea* mogu da rastu brže na hranljivoj podlozi bez fungicida nego sojevi normalne osetljivosti. Ovakve pojave se objašnjavaju izrazitom prirodnom varijabilnošću vrste *B. cinerea* (Pommer i Lorenz, 1995), kao i različitim eksperimentalnim uslovima (Gouot, 1994).

Poznato je da je osetljivost fitopatogenih gljiva na povećanje osmotskog pritiska u negativnoj korelaciji sa patogenošću (Beever, 1983; loc. cit. Faretra i Pollastro, 1993; Beever i Brien, 1983; Leroux i Fritz, 1983; loc. cit. Pommer i Lorenz, 1995). Kad je reč o sojevima *B. cinerea* rezistentnim na dikarboksimide, rezultati su protivrečni. U najvećem broju slučajeva rezistentni sojevi su osetljiviji na povećan osmotski pritisak, pa samim tim i slabije patogeni od sojeva normalno osetljivih na dikarboksimide (Beever i Brien, 1983). Međutim, Pommer i Lorenz (1995) smatraju da rezistentnost na dikarboksimide i osetljivost na povećan osmotski pritisak nisu uvek u korelaciji.

Imajući u vidu raznolike literaturne podatke koji se odnose na karakteristike rezistentnih sojeva *B. cinerea*, kao i izraženu visoku varijabilnost ove fitopatogene vrste, cilj ovog rada bilo je uporedno proučavanje bioloških odlika izolata *B. cinerea* različite osetljivosti na dikarboksimide.

MATERIJAL I METODE

Test supstance

- *Iprodion* [3-(3,5-dichlorophenyl)-N-isopropyl-2,4-dioximidazolidine-1-carboxamide], preparat Kidan EC, proizvod kompanije Aventis.
- *Vinklozolin* [(RS) - 3 - (3,5 - dichlorophenyl - 5-methyl- 5-vinyl- 1,3-oxazolidine -2,4-dione)], preparat Ronilan WG, proizvod kompanije BASF.
- *Benomil* [Methyl 1-(butylcarbamoyl)benzimidazol-2-ylcarbamate], preparat Benfungin WP, proizvod kompanije „Galenika-Fitofarmacija”.
- *Prothloraz* [N-propyl-N-[2-(2,4,6-trichlorophenoxy)ethyl]imidazole-1-carboxamide], preparat Octave WP, proizvod kompanije Aventis CropScience.

Izolati *B. cinerea*

Izolati iz prirodnih populacija

Patogen je izolovan iz obolelih delova jagode, maline, vinove loze i salate, prethodno inkubiranih u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi kako bi se izazvala sporulacija (Locher i Lorenz, 1991). Podaci o lokalitetima, vremenu izolacije i broju izolata prikazani su u Tabeli 1. Dobijeni izolati su prečišćeni do monosporijalnih kultura i, nakon provere patogenosti, čuvani na zakošenoj KDA podlozi u frižideru na temperaturi od 4°C (Dhingra i Sinclair, 1995). Postupak dobijanja monosporijalnih izolata i provere patogenosti detaljno je opisan u jednom od prethodnih radova (Tanović, 2003).

Laboratorijski rezistentni izolati

Laboratorijski rezistentni izolati *B. cinerea* dobijeni su delimično modifikovanom *Crossed-Paper* metodom koju su De Waard i Nistelrooy (1982) uveli u primenu za testiranje toksičnosti fungicida u prisustvu drugih supstanci, a koja je opisana u radu Tanović (2004). Podaci o ovim izolatima prikazani su u Tabeli 2.

Provera osetljivosti laboratorijskih izolata *B. cinerea* na fungicide

Radi provere osetljivosti praćen je porast micelije laboratorijski dobijenih izolata na podlogama u koje su dodati fungicidi u sledećim koncentracijama:

- Iprodion ili vinklozolin (dikarboksimidi) – 10 mg/L (Locher i Lorenz, 1991);
- Benomil (benzimidazoli) – 5 mg/L (Stehmann, 1995);
- Prochloraz (imidazoli) – 10 mg/L; arbitrarno određena koncentracija na osnovu rezultata oglada Pappas-a i Fisher-a (1979) i Leroux-a i Gredt-a (1984).

Porast na podlozi koja sadrži fungicid poreden je sa kontrolom (podloga bez fungicida). Kao dopunska kontrola, korišćeni su i odgovarajući osetljivi izolati. Oglad je izveden u četiri ponavljanja, a izolati su smatrani rezistentnim ako posle inkubacije od 48 h rastu na podlozi sa diskriminativnom koncentracijom fungicida (Faretra i Pollastro, 1991).

Patogenost rezistentnih izolata *B. cinerea*

Patogenost dobijenih rezistentnih izolata ispitana je na kriškama jabuke. Plodovi jabuke su oprani u blagom rastvoru deterdženta, isprani destilovanom vodom i osušeni papirnom vatom. Sterilnim skalperom su isečene kriške i na njih nanet fragment KDA pod-

Tabela 1. Poreklo izolata *B. cinerea* iz prirodnih populacija
Table 1. Origin of isolates of *B. cinerea* from natural population

Domaćin – Host	Lokalitet Locality	Datum izolacije Isolation date	Oznaka izolata Code of isolates	Broj izolata No. of isolates
Jagoda – Strawberry	Preljina	28. maj 2001.	J 15; J 20; J 32	4
	Surčin	8. jun 2001.	J 3	
Malina – Raspberry	Uzići	18. jul 2001.	M 47; M 49; M 50	3
Vinova loza – Vine	Niš	1. oktobar 2001.	V 66; V 68; V 71; V 75	4
Salata – Lettuce	Zvezd	3. april 2002.	S 102; S 108; S 125	4

Tabela 2. Poreklo rezistentnih izolata *B. cinerea*
Table 2. Origin of resistant isolates of *B. cinerea*

Domaćin Host	Izolat iz prirodne populacije Isolate from natural population	Odgovarajući rezistentan izolat Corresponding resistant isolate
Jagoda – Strawberry	J 3	J 3f
Jagoda – Strawberry	J 15	J 15f
Malina – Raspberry	M 47	M 47f
Malina – Raspberry	M 49	M 49f
Salata – Lettuce	S 125	S 125f

loge, prečnika 1 cm, sa micelijom čiste kulture ispitivanog izolata. Na plod u kontroli nanet je fragment sterilne KDA podloge. Inokulisane kriške su postavljene na vlažan filter-papir u petri-kutije i inkubirane na temperaturi od 20°C. Nakon tri dana inkubacije, meren je prečnik površine natrulog tkiva oko mesta inokulacije rezistentnim i osetljivim izolatom. Ogljed je izveden u tri ponavljanja sa po dve kriške po ponavljanju. Analizom varijanse i LSD testom utvrđeno je statistička značajnost razlike aritmetičkih sredina prečnika natrulog tkiva. Reizolacijom je potvrđeno da su simptomi posledica patogene aktivnosti proučavanih izolata.

Morfološke odlike izolata *B. cinerea*

Nakon inkubacije od 10 dana na KDA podlozi na temperaturi od 20°C, posmatran je izgled kolonije, odlike ruba kolonije, boja, prisustvo sklerocija i konidija, i pigmentacija podloge. Pravljeni su privremeni mikroskopski preparati od micelije stare deset dana i posmatran izgled hifa, oblik i veličina konidija, kao i prisustvo i izgled sklerocija i drugih tvorevina parazita (Muntanjola-Cvetković, 1987).

Odgajivačke odlike izolata *B. cinerea*

Od odgajivačkih odlika proučen je uticaj različitih hranljivih podloga i uticaj kiselosti KDA podloge na porast izolata. Isečci podloge prečnika 10 mm sa micelijom parazita, uzeti sa ivice kolonije gljive gajene na KDA podlozi tokom četiri dana, nanošeni su na različite hranljive podloge i inkubirani tri dana na temperaturi od 20°C. Prečnik kolonije je meren u dva pravca pod pravim uglom. Ogljed je izveden u četiri ponavljanja a podaci su obrađeni analizom varijanse. Značajnost razlika u prosečnom porastu testirana je LSD testom.

Uticaj hranljive podloge na porast izolata *B. cinerea*

Porast micelije ispitivanog izolata praćen je na sledećim podlogama: krompir-dekstroznom agaru (KDA), malt agaru, Čapekovoju podlozi (Muntanjola-Cvetković, 1987), vodenom agaru i podlozi od zrna pšenice (Dhingra i Sinclair, 1995).

Uticaj kiselosti podloge na porast izolata *B. cinerea*

Uticaj kiselosti KDA podloge na porast micelije je praćen u intervalu od 5 do 9 pH jedinica na temperaturi od 20°C (Dhingra i Sinclair, 1995).

Ekološke odlike izolata *B. cinerea*

Uticaj temperature na porast izolata B. cinerea

Izolati *B. cinerea* su gajeni na KDA podlozi na temperaturama od: 10, 15, 20, 25 i 30°C. Prečnik micelije je meren posle tri dana od zasejavanja. Ogljed je izveden u četiri ponavljanja a podaci obrađeni analizom varijanse (Dhingra i Sinclair, 1995).

Uticaj svetlosti na porast izolata B. cinerea

Uticaj svetlosti na porast izolata *B. cinerea* proučen je gajenjem gljive u prisustvu stalnog neonskog svetla i u mraku na KDA podlozi na sobnoj temperaturi. Prečnik kolonije je meren nakon tri dana od zasejavanja.

Osetljivost izolata *B. cinerea* na povećan osmotski pritisak

Osetljivost izolata *B. cinerea* na povećan osmotski pritisak proučena je po metodi Beever i Brien (1983). U otopljenu KDA podlogu je dodavan rastvor NaCl do finalne koncentracije od 0.68 mol/dm³ NaCl, a u kontrolu sterilna destilovana voda. Podloga je zasejana isečcima micelije izolata prečnika 10 mm. Prečnik micelije izmeren je posle tri dana inkubacije na temperaturi od 20°C i izračunat procenat inhibicije porasta micelije u odnosu na kontrolu. Ogljed je izveden u četiri ponavljanja.

Provera rezistentnosti laboratorijskih izolata *B. cinerea* na dikarboksimide *in vivo*

Kriterijum za rezistentnost bila je mogućnost izolata da ostvare infekciju u prisustvu 10 mg/L iprodiona. Za ova ispitivanja korišćeni su nepovređeni primarni listovi suncokreta, sa biljaka starih 10 dana, gajenih u uslovima dugog dana (16 časova veštačkog osvetljenja dnevno, t = 25-27°C). Odsečeni listovi su, licem okrenutim na dole, postavljeni na filter-papir u petri-kutije. Filter-papir je natopljen emulzijom iprodiona (5 ml) koncentracije 10 mg/L. Na listove je zatim postavljen isečak filter-pa-

pira, prečnika 15 mm (prethodno potopljen u emulziju fungicida koncentracije 10 mg/L) preko koga je nanesen fragment KDA podloge sa micelijom ispitivanih izolata. Ovim postupkom je obezbeđeno stalno prisustvo fungicida na mestu kontakta micelije i lista suncokreta. Ogljed je izveden u tri ponavljanja sa po tri do četiri lista po ponavljanju uz uključene dve kontrole; u prvom je umesto fungicida bila sterilisana destilovana voda a u drugom je, umesto ispitivanim, potencijalno rezistentnim izolatom, inokulacija vršena osetljivim izolatom. Posle inkubacije od tri dana posmatrana je pojava truleži tkiva listova suncokreta ispod filter-papira.

REZULTATI

Osetljivost rezistentnih izolata *B. cinerea* na fungicide

Svi rezistentni (f) izolati su se razvijali na KDA podlozi koja sadrži 10 mg/L iprodiona ili vinklozolina, dok su benomil i prochloraz u podlozi potpuno inhibirali rast ovih izolata (Tabela 3).

Patogenost rezistentnih izolata *B. cinerea*

Svi dobijeni rezistentni izolati su se razvijali na kriškama inokulisanih plodova jabuke, prouzrokujući trulež tkiva svetlo smeđe boje, karakterističnu za *B. cinerea*. Od mesta inokulacije trulež se širila zahvatajući kako mezokarp tako i pokožicu ploda (Slika 1).

Analiza varijanse i LSD test su pokazali da je patogenost rezistentnih izolata statistički značajno slabije izražena u odnosu na patogenost odgovarajućih osetljivih izolata ($F = 132.2^*$; $LSD_{0,05;50} = 3.14$). Izuzetak je izolat M 49f koji se po patogenosti ne razlikuje od odgovarajućeg izolata M 49 na nivou $p = 0.05$ (Slike 2 i 3).

Morfološke odlike izolata *B. cinerea*

Svi izolati *B. cinerea* iz prirodnih populacija formiraju belu, uniformnu, rastresitu, vazдушnu miceliju ravnog oboda koja na temperaturi od 20°C pokriva KDA podlogu u petri-kutiji (9 cm) za najviše četiri dana. Posle šestog dana razvoja primećuju se zrakasto raspoređene zone supstratne micelije koje se smenjuju sa delimično vaz-

Tabela 3. Osetljivost rezistentnih (f) izolata *B. cinerea* i izolata od kojih su dobijeni na različite fungicide u KDA podlozi
Table 3. Sensitivity of resistant isolates of *B. cinerea* and original isolates sensitive to different fungicides incorporated in PDA medium

Izolat Isolate	Porast izolata – Mycelial growth (mm)				
	Iprodion Iprodione (10 mg/L)	Vinklozolin Vinclozolin (10 mg/L)	Benomil Benomyl (5 mg/L)	Prochloraz Prochloraz (10 mg/L)	Kontrola Control (H ₂ O)
J 3	-	-	-	-	+++
J 3f	++	++	-	-	++
J 15	-	-	-	-	+++
J 15f	++	++	-	-	++
M 47	-	-	-	-	+++
M 47f	++	++	-	-	+
M 49	-	-	-	-	+++
M 49f	+	+	-	-	++
S 125	-	-	-	-	+++
S 125f	+	+	-	-	++

J = Jagoda; M = Malina; S = Salata; f = Laboratorijski dobijeni rezistentni izolati

+++ = Prečnik porasta >15 mm

++ = Prečnik porasta 10-15 mm

+ = Prečnik porasta < 10 mm

- = Nema porasta

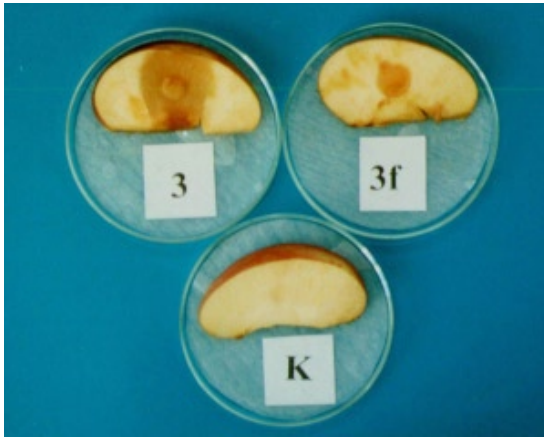
J = Strawberry; M = Rasperry; S = Lattuce; f = Resistant isolate obtained in the laboratory

+++ = Diameter of the mycelial growth > 15 mm

++ = Diameter of the mycelial growth 10-15 mm

+ = Diameter of the mycelial growth < 10 mm

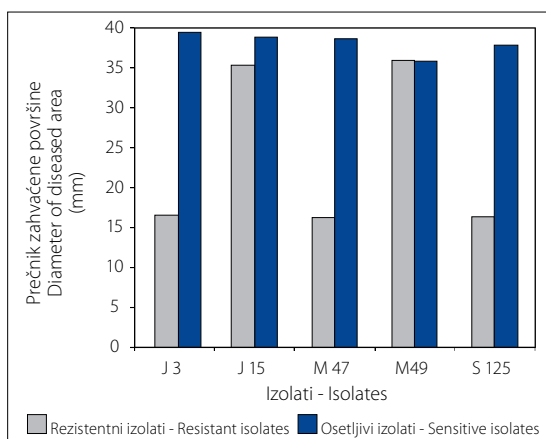
- = Mycelial growth not observed



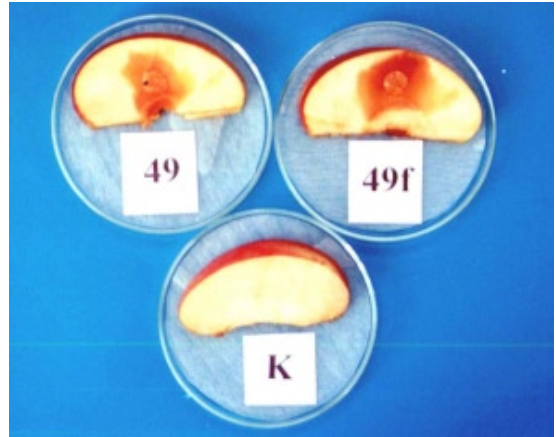
Slika 1. Patogenost rezistentnog izolata J 3f *B. cinerea* u poređenju sa izolatom J 3 od koga je dobijen
Figure 1. Pathogenicity of resistant isolates J 3f of *B. cinerea* compared to original sensitive isolate J 3

dušnom kompaktnom micelijom. Nakon sedam dana se formiraju konidije, a sklerocije su potpuno formirane desetog dana (Slika 4). Lučenje pigmenta u podlogu nije zabeleženo. Na osnovu morfoloških osobina nije bilo moguće podeliti izolate u jasno definisane grupe.

Micelija laboratorijski dobijenih izolata *B. cinerea*, rezistentnih na dikarboksimide, je bela, uniformna i supstratna, ravnog oboda. Petri-kutiju ispunjava za najviše sedam dana na temperaturi od 20°C. Posle 10-12 dana razvoja na podlozi koja sadrži iprodion, rezistentni izolati počinju da luče smeđi pigment u podlogu. Ovaj pigment se pojavljuje i tokom nekoliko presejavanja na



Slika 2. Patogenost laboratorijskih rezistentnih izolata *B. cinerea* u poređenju sa osetljivim izolatima od kojih su dobijeni; J = Jagoda; M = Malina; S = Salata
Figure 2. Pathogenicity of resistant isolates of *B. cinerea* obtained in the laboratory compared to original sensitive isolates; J = Strawberry; M = Raspberry; S = Lettuce



Slika 3. Patogenost rezistentnog izolata M 49f of *B. cinerea* u poređenju sa izolatom M 49 od koga je dobijen
Figure 3. Pathogenicity of resistant isolates M 49f of *B. cinerea* compared to original sensitive isolate M 49

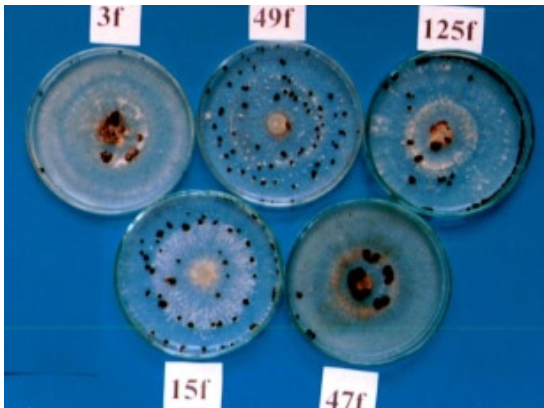
podlogu bez fungicida; posle petog presejavanja ovu osobinu zadržava samo izolat M 47f (Slika 5). Ostali izolati presejavanjem na podlogu bez fungicida postaju morfološki slični izolatima *B. cinerea* od kojih su dobijeni.

Hife su septirane, hijalinske i razgranate, sa često prisutnim anastomozama. Konidiofore su duge, smeđe, pri vrhu razgranate (karakteristično grananje „tipa botrytis“) (Slika 6). Konidije su sivo smeđe, elipsoidne, hidrofobne, prosečne veličine 9.10 μm (8.15-10.03 μm) x 7.43 μm (6.46-8.42 μm).

Izolati *B. cinerea* počinju da sporulišu od sedmog dana na KDA podlozi i temperaturi od 20°C, pri čemu



Slika 4. Izolat *B. cinerea* poreklom iz prirodne populacije posle deset dana razvoja na KDA podlozi
Figure 4. *B. cinerea* isolate originating from natural population after 10-day incubation on PDA medium



Slika 5. Laboratorijski rezistentni izolati *B. cinerea* posle sedam presejavanja na KDA podlogu bez fungicida

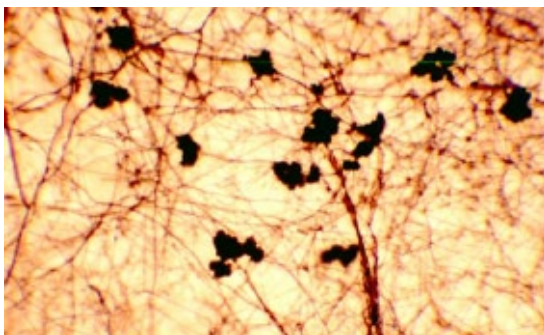
Figure 5. Resistant isolates of *B. cinerea* after seven successive transfers on fungicide-free PDA medium

je intenzitet sporulacije veoma slab. Samo izolat S 125 obilno sporuliše pri čemu konidiofore i konidije prekrivaju celu površinu kolonije.

Crne sklerocije nepravilnog oblika prisutne su kod svih izolata *B. cinerea* posle inkubacije od deset dana na 20°C, osim kod izolata S 125. Gornja površina sklerocije (plektenhim) je konveksna a donja konkavna (Slika 7). Pseudoparenhim je beo, izgrađen od labavo isprepletanih tankih hifa, uronjenih u želatinoznu hijalinsku masu. Sklerocije osetljivih i rezistentnih izolata se ne razlikuju ni po obliku ni po strukturi.

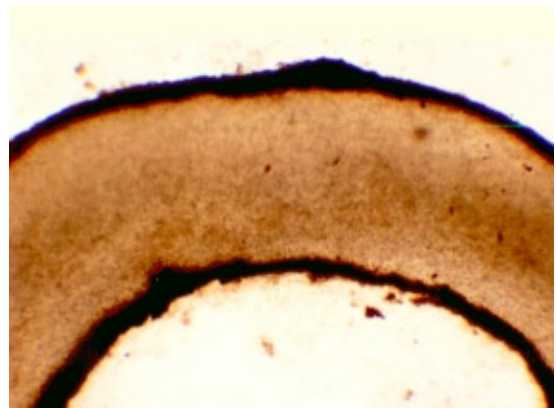
Fijalokonidiofore i fijalokonidije u nizovima prisutne su u kulturama svih proučavanih izolata. U kulturama rezistentnih izolata primećene su i velike grupe fijalokonidija u zaštitnom omotaču i spermadohije u „praznim“ ćelijama hifa.

Savršen stadijum gljive (*Botriotinia fuckeliana*) u ovom radu nije dobijen.



Slika 6. Konidiofore i konidije *B. cinerea* na KDA podlozi (uvećanje 13 x)

Figure 6. Conidiophores and conidia of *B. cinerea* on PDA medium (x 13)



Slika 7. Presek sklerocije izolata M 47f *B. cinerea* (uvećanje 13 x)

Figure 7. Section of sclerotium of the isolate M 47f *B. cinerea* (x 13)

Odgajivačke odlike izolata *B. cinerea*

Uticaj hranljive podloge na porast micelije izolata *B. cinerea*

Osetljivi izolati su prosečno najbolje rasli na malt i KDA podlozi (76.1 mm i 71.1 mm), a najslabije na vodenom agaru (26.2 mm). Rezultati testa najmanje značajne razlike (LSD test) pokazuju da, na nivou verovatnoće 0.05, nema statistički značajne razlike u porastu izolata na KDA i malt podlozi, kao i da Čapekova podloga i podloga od zrna pšenice jednako utiču na porast micelije. Porast osetljivih izolata na vodenom agaru se statistički značajno razlikuje od porasta na ostalim podlogama (Tabela 4).

Najbolji prosečan porast visokorezistentnih izolata zabeležen je na KDA podlozi (52.1 mm), a najslabiji na vodenom agaru (23.9 mm). Na nivou verovatnoće 0.05 nema statistički značajne razlike u porastu na KDA, malt podlozi, podlozi od zrna pšenice i Čapek podlozi. Porast na vodenom agaru se ne razlikuje značajno od porasta na Čapek podlozi (Tabela 5).

Uticaj kiselosti podloge na porast micelije izolata *B. cinerea*

Kiselost KDA podloge statistički značajno utiče na porast i osetljivih i rezistentnih izolata (Tabele 6 i 7). Osetljivi izolati imaju najbolji prosečan porast pri pH 5 (60.2 mm), pri čemu LSD test pokazuje da nema statistički značajne razlike u porastu izolata pri pH 5, pH 6 i pH 7 na nivou verovatnoće 0.05. Zabeležen je i statistički značajno slabiji porast osetljivih izolata pri pH 9 (45.6 mm prosečno) (Tabela 6).

Tabela 4. Uticaj različitih hranljivih podloga na porast micelije izolata *B. cinerea* osetljivih na dikarboksimide
Table 4. Influence of different media on the growth rate of *B. cinerea* isolates that are sensitive to dicarboximides

Izolat Isolate	Prosečan prečnik micelije ¹ - Diameter of mycelial growth (mm)				
	Čapek agar Czapek agar	Vodeni agar Water agar	Malt agars	Agar od pšenice Wheat agar	KDA PDA
J 3	56.8	27.4	79.0	60.2	70.4
J 15	46.8	27.2	72.4	68.6	88.0
J 20	71.2	31.8	86.0	68.6	88.0
J 32	56.0	26.8	73.2	60.2	76.8
M 47	69.0	27.2	84.4	59.4	80.4
M 49	55.0	35.4	65.8	50.8	68.0
M 50	44.8	19.6	68.2	44.3	56.0
V 66	57.2	25.0	75.0	57.8	73.0
V 68	47.2	26.0	69.2	59.2	72.4
V 71	75.8	21.2	73.8	61.0	78.2
V 75	44.8	25.2	84.2	56.2	57.8
S 102	55.2	20.4	73.3	57.4	60.4
S 108	44.8	24.8	80.4	56.2	75.2
S 125	66.0	29.0	80.2	58.4	71.2
Ms ± Sd	56.5 ± 10.5 b*	26.2 ± 4.2 c	76.1 ± 6.4 a	57.2 ± 5.7 b	71.1 ± 8.8 a

J = Jagoda; M = Malina; V = Vinova loza; S = Salata

¹Prečnik kolonije nakon inkubacije od tri dana

*Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike na nivou p = 0.05

Ms ± Sd = Srednja vrednost i standardna devijacija

(F = 94.49*; LSD_{0.05;65} = 8.96)

J = Strawberry; M = Raspberry; V = Vine; S = Lattuce

¹Diameter of the mycelial growth after three-day incubation

*Mean values followed by the same letters are not significantly different (p = 0.05)

Ms ± Sd = Mean Value ± Standard Deviation

Tabela 5. Uticaj različitih hranljivih podloga na porast micelije izolata *B. cinerea* visokorezistentnih na dikarboksimide
Table 5. Influence of different media on the growth rate of *B. cinerea* isolates highly resistant to dicarboximides

Izolat Isolate	Prosečan prečnik micelije ¹ - Diameter of mycelial growth (mm)				
	Čapek agar Czapek agar	Vodeni agar Water agar	Malt agar	Agar od pšenice Wheat agar	KDA PDA
J 3f	35.8	33.0	35.4	45.2	48.2
J 15f	46.2	21.2	66.4	48.8	55.0
M 47f	33.4	20.5	31.2	40.4	39.4
M 49f	47.4	31.0	66.2	59.4	74.2
S 125f	36.2	14.0	28.2	35.4	43.8
Ms ± Sd	39.8 ± 6.5 ab*	23.9 ± 7.9 b	45.5 ± 19.2 a	45.8 ± 9.1 a	52.1 ± 19.8 a

J = Jagoda; M = Malina; S = Salata; f = Laboratorijski dobijeni rezistentni izolati

¹Prečnik kolonije nakon inkubacije od tri dana

*Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike na nivou p = 0.05

Ms ± Sd = Srednja vrednost i standardna devijacija

(F = 3.87*; LSD_{0.05;20} = 16.04)

J = Strawberry; M = Raspberry; S = Lattuce; f = Resistant isolate obtained in the laboratory

¹Diameter of the mycelial growth after three-day incubation

*Mean values followed by the same letters are not significantly different (p = 0.05)

Ms ± Sd = Mean Value ± Standard Deviation

Nema statistički značajne razlike u prosečnom porastu visokorezistentnih izolata na podlogama pH 5, pH 6 i pH 7. Najslabiji porast je bio na podlozi pH 9 (37.8 mm). Međutim, prema LSD testu, on se statistički značajno ne razlikuje od porasta na podlogama pH 7 i pH 8 (Tabela 7).

Ekološke odlike izolata *B. cinerea*

Uticaj temperature na porast micelije izolata *B. cinerea*

Analiza varijanse je pokazala da temperatura statistički značajno utiče na porast kako osetljivih tako i rezistentnih izolata.

Utvrđeno je da osetljivi izolati prosečno najbolje rastu na temperaturi od 20°C (71.1 mm) a najslabije na temperaturi od 10°C (25.3 mm). Ove vrednosti se statistički značajno razlikuju od rezultata dobijenih za porast micelije na ostalim ispitivanim temperaturama.

Porast micelije osetljivih izolata se ne razlikuje značajno na temperaturama 15 i 25°C (Tabela 8).

Nije registrovana statistički značajna razlika u prosečnom porastu rezistentnih izolata *B. cinerea* na temperaturama od 20°C i 15°C (52.2 mm i 46.5 mm). Statistički značajno slabiji prosečan porast rezistentnih izolata zabeležen je na temperaturi od 10°C (Tabela 9).

Uticaj osvetljenja na porast micelije izolata *B. cinerea*

Nakon inkubacije od tri dana osetljivi izolati prosečno rastu 70.4 mm na svetlu a 68.0 mm u mraku, dok su odgovarajuće vrednosti za rezistentne izolate 50.7 mm i 46.0 mm. Analiza varijanse je pokazala da uslovi osvetljenja ne utiču na porast ispitivanih izolata na nivou verovatnoće 0.05 (Tabele 10 i 11).

Tabela 6. Uticaj kiselosti podloge na porast izolata *B. cinerea* osetljivih na dikarboksimide

Table 6. Influence of pH value of PDA medium on the growth rate of *B. cinerea* isolates that are sensitive to dicarboximides

Izolat Isolate	Prosečan prečnik micelije ¹ - Diameter of mycelial growth (mm)				
	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
J 3	60.8	64.4	61.8	51.8	44.2
J 15	61.4	54.0	47.8	43.8	39.4
J 20	67.6	65.8	64.2	64.0	52.8
J 32	58.2	55.0	60.0	54.2	49.8
M 47	69.4	67.4	81.6	57.2	48.2
M 49	58.6	59.8	44.2	47.8	31.4
M 50	41.8	40.2	41.8	38.6	36.2
V 66	51.8	50.4	52.4	52.4	41.2
V 68	61.0	64.2	56.8	59.8	52.4
V 71	65.8	62.4	66.4	57.0	54.2
V 75	53.8	57.4	55.0	51.8	46.8
S 102	64.2	51.2	52.0	50.2	40.2
S 108	65.8	64.0	60.8	63.8	52.8
S 125	63.0	55.4	58.8	51.0	49.4
Ms ± Sd	60.2 ± 7.2 a*	58.0 ± 7.5 ab	57.4 ± 10.1ab	53.1 ± 7.1 b	45.6 ± 7.0 c

J = Jagoda; M = Malina; V = Vinova loza; S = Salata

¹Prečnik kolonije nakon inkubacije od tri dana

*Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike na nivou p = 0.05

Ms ± Sd = srednja vrednost i standardna devijacija

(F = 7.47*; LSD_{0.05;65} = 5.96)

J = Strawberry; M = Raspberry; V = Vine; S = Lettuce

¹Diameter of the mycelial growth after three-day incubation

*Mean values followed by the same letters are not significantly different (p = 0.05)

Ms ± Sd = Mean Value ± Standard Deviation

Tabela 7. Uticaj kiselosti podloge na porast izolata *B. cinerea* visokorezistentnih na dikarboksimide**Table 7.** Influence of pH value of PDA medium on the growth rate of *B. cinerea* isolates highly resistant to dicarboximides

Izolot Isolate	Prosečan prečnik micelije ¹ – Diameter of mycelial growth (mm)				
	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
J 3f	48.4	47.0	44.2	47.0	45.2
J 15f	48.8	48.2	41.2	42.0	33.6
M 47f	46.2	46.2	47.2	29.4	40.4
M 49f	58.2	46.4	45.4	46.2	34.4
S 125f	44.8	36.0	41.2	36.8	35.4
Ms ± Sd	49.3 ± 5.2 a*	44.8 ± 4.9 a	43.8 ± 2.6 ab	40.3 ± 7.3 b	37.8 ± 4.9 b

J = Jagoda; M = Malina; S = Salata; f = Laboratorijski dobijeni rezistentni izolati

¹Prečnik kolonije nakon inkubacije od tri dana.

*Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike na nivou p = 0.05

Ms ± Sd = Srednja vrednost i standardna devijacija

(F = 3.53³; LSD_{0.05;20} = 6.90)

J = Strawberry; M = Raspberry; S = Lettuce; f = Resistant isolate obtained in the laboratory

¹Diameter of the mycelial growth after three-day incubation

*Mean values followed by the same letters are not significantly different (p = 0.05)

Ms ± Sd = Mean Value ± Standard Deviation

Tabela 8. Uticaj temperature na porast micelije izolata *B. cinerea* osetljivih na dikarboksimide**Table 8.** Influence of temperature on the growth rate of *B. cinerea* isolates that are sensitive to dicarboximides

Izolot Isolate	Prosečan prečnik micelije ¹ – Diameter of mycelial growth (mm)				
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
J 3	23.0	67.8	70.4	62.4	37.6
J 15	23.6	68.8	67.6	68.2	38.2
J 32	29.2	65.6	76.8	52.2	27.6
J 20	33.2	67.8	88.0	46.2	19.2
M 47	23.0	61.2	80.4	75.2	35.2
M 49	21.6	53.2	68.0	65.0	27.0
M 50	27.0	66.4	56.0	48.2	25.8
V 66	23.2	58.2	73.0	69.6	30.4
V 68	22.8	64.2	72.4	58.0	28.2
V 71	27.2	66.0	78.2	75.6	33.2
V 75	16.0	54.2	57.8	75.8	27.8
S 102	32.0	64.4	60.4	65.2	39.4
S108	30.8	64.8	75.2	72.2	40.2
S 125	21.0	64.2	71.2	60.4	31.6
Ms ± Sd	25.3 ± 4.8 d*	63.3 ± 4.9 b	71.1 ± 8.8 a	63.9 ± 9.9 b	31.5 ± 6.0 c

J = Jagoda; M = Malina; V = Vinova loza; S = Salata

¹Prečnik kolonije nakon inkubacije od tri dana

*Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike na nivou p = 0.05

Ms ± Sd = Srednja vrednost i standardna devijacija

(F = 118.34; LSD_{0.05;65} = 5.46)

J = Strawberry; M = Raspberry; V = Vine; S = Lettuce

¹Diameter of the mycelial growth after three-day incubation

*Mean values followed by the same letters are not significantly different (p = 0.05)

Ms ± Sd = Mean Value ± Standard Deviation

Tabela 9. Uticaj temperature na porast micelije izolata *B. cinerea* visokorezistentnih na dikarboksimide
Table 9. Influence of temperature on the growth rate of *B. cinerea* isolates highly resistant to dicarboximides

Izolat Isolate	Prosečan prečnik micelije ¹ – Diameter of mycelial growth (mm)				
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
J 3f	19.6	37.0	48.2	41.0	26.4
J 15f	25.2	63.0	55.0	59.4	38.6
M 47f	19.6	38.4	39.6	40.4	25.0
M 49f	20.4	54.0	74.2	45.0	28.0
S 125f	19.8	40.0	43.8	39.8	23.8
Ms ± Sd	20.9 ± 2.4 d*	46.5 ± 11.5ab	52.2 ± 13.5 a	38.4 ± 8.2 bc	28.4 ± 5.9 cd

J = Jagoda; M = Malina; S = Salata; f = Laboratorijski dobijeni rezistentni izolati

¹Prečnik kolonije nakon inkubacije od tri dana

*Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike na nivou p = 0.05

Ms ± Sd = Srednja vrednost i standardna devijacija

(F = 10.38; LSD_{0.05;20} = 12.16)

J = Strawberry; M = Raspberry; S = Lettuce; f = Resistant isolate obtained in the laboratory

¹Diameter of the mycelial growth after three-day incubation

*Mean values followed by the same letters are not significantly different (p = 0.05)

Ms ± Sd = Mean Value ± Standard Deviation

Tabela 10. Uticaj uslova osvetljenja na porast micelije izolata *B. cinerea* osetljivih na dikarboksimide
Table 10. Influence of light on the growth rate of *B. cinerea* isolates that are sensitive to dicarboximides

Izolat Isolate	Prosečan prečnik micelije ¹ – Diameter of mycelial growth (mm)	
	Svetlo – Light	Tama – Darkness
J 3	80.0	79.8
J 15	78.0	78.8
J 20	70.2	64.8
J 32	56.0	47.8
M 47	71.8	74.0
M 49	40.0	48.2
M 50	62.0	52.5
V 66	71.8	64.0
V 68	73.8	69.5
V 71	81.8	77.5
V 75	76.0	74.8
S 102	79.4	78.5
S 108	78.5	78.8
S 125	66.2	63.2
Ms ± Sd	70.4 ± 11.4 a*	68.0 ± 11.6 a

J = Jagoda; M = Malina; V = Vinova loza; S = Salata

¹Prečnik kolonije nakon inkubacije od tri dana

*Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike na nivou p = 0.05

Ms ± Sd = Srednja vrednost i standardna devijacija

(F = 0.30)

J = Strawberry; M = Raspberry; V = Vine; S = Lettuce

¹Diameter of the mycelial growth after three-day incubation

*Mean values followed by the same letters are not significantly different (p = 0.05)

Ms ± Sd = Mean Value ± Standard Deviation

Tabela 11. Uticaj uslova osvetljenja na porast micelije izolata *B. cinerea* visokorezistentnih na dikarboksimide
Table 11. Influence of light on the growth rate of *B. cinerea* isolates highly resistant to dicarboximides

Izolati Isolates	Prosečan prečnik micelije ¹ – Diameter of mycelial growth (mm)	
	Svetlo – Light	Tama – Darkness
J 3f	39.0	37.5
J 15f	73.0	68.0
M 47f	31.0	31.0
M 49f	69.0	57.2
S 125f	41.5	38.2
Ms ± Sd	50.7 ± 19.0 a*	46.4 ± 15.5 a

J = Jagoda; M = Malina; S = Salata; f = Laboratorijski dobijeni rezistentni izolati

¹Prečnik kolonije nakon inkubacije od tri dana

*Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike na nivou p = 0.05

Ms ± Sd = Srednja vrednost i standardna devijacija

(F = 0.15)

J = Strawberry; M = Raspberry; V = Vine; S = Lettuce; f = Resistant isolate obtained in the laboratory

¹Diameter of the mycelial growth after three-day incubation

*Mean values followed by the same letters are not significantly different (p = 0.05)

Ms ± Sd = Mean Value ± Standard Deviation

Rast izolata *B. cinerea*, broj formiranih sklerocija i osetljivost na dikarboksimide

Od osetljivih izolata prosečno najbrže raste izolat J 20 (29.3 mm/dan) a najsporije izolat M 50 (18.7 mm/dan); od rezistentnih izolata najbrži porast micelije ima izolat M 49f (24.7 mm/dan) a najsporije raste izolat M 47f (13.1 mm/dan) (Tabela 16). Osetljivi izolati prosečno brže rastu od rezistentnih. Izuzetak je rezistentan izolat M 49f koji se u porastu ne razlikuje od osetljivog izolata S 108. Nema razlike ni u porastu osetljivih izolata V 75 i M 50 i rezistentnog izolata J 15f (Tabela 12).

Prosečno najviše sklerocija formira izolat V 68 (86.0) a najmanje izolat S 125 (0). Broj sklerocija koje su formirali f izolati se kretao od 4.0 (izolat M 47f) do 24.7 (izolat M 49f). Razlike između izolata, kako u brzini rasta tako i u broju formiranih sklerocija bile su statistički značajne na nivou verovatnoće 0.05 (Tabela 12).

Nije utvrđena statistički značajna korelacija između brzine rasta izolata *B. cinerea* i broja formiranih sklerocija ($r = 0.43$; $t = 1.96$). Korelacija između broja sklerocija i osetljivosti na iprodion i vinklozolin je, takođe, bila veoma slaba – odgovarajući koeficijenti korelacije $r_{ip.} = -0.36$ ($t = 1.59$) i $r_{vk.} = -0.31$ ($t = 1.34$) nisu bili statistički značajni.

Četiri od pet proučavanih rezistentnih izolata *B. cinerea* formira statistički značajno manji broj sklerocija nego osetljivi izolati (Tabela 12). Rezistentni izolat S

125f formira više sklerocija od odgovarajućeg osetljivog izolata S 125. Sa promenom osetljivosti na dikarboksimide izolat S 125 izgubio je sposobnost obilne sporulacije tako da dobijeni izolat S 125f sporuliše slabo, kao i ostali izolati proučavani u ovom radu.

Koeficijent korelacije između brzine rasta izolata i EC₅₀ vrednosti za iprodion je bio $r = -0.70^{**}$ ($t = 4.04$), a za vinklozolin $r = -0.74^{**}$ ($t = 4.27$). Oba koeficijenta su statistički vrlo značajna (nivo verovatnoće 0.01). To znači da postoji visoka negativna korelacija između brzine rasta izolata i rezistentnosti na dikarboksimide.

Osetljivost izolata *B. cinerea* na povećan osmotski pritisak i rezistentnost na dikarboksimide

Koeficijenti korelacije između osetljivosti izolata *B. cinerea* na povećan osmotski pritisak i rezistentnosti na iprodion i vinklozolin su iznosili $r = -0.90^{**}$ ($t = 8.51$) i $r = -0.73^{**}$ ($t = 4.40$). Prema tome, postoji visoka negativna korelacija između osetljivosti na povećan osmotski pritisak i rezistentnosti na dikarboksimide.

Provera rezistentnosti laboratorijskih izolata *B. cinerea* na dikarboksimide *in vivo*

Svi laboratorijski f izolati su se razvijali na listovima sunčokreta kako u prisustvu iprodiona tako i u kontro-

Tabela 12. Brzina rasta i broj formiranih sklerocija izolata *B. cinerea*
Table 12. Growth rate of *B. cinerea* isolates and number of sclerotia produced

Izolat Isolate	Dnevni porast – Daily growth (mm/dan ± Sd)	Broj sklerocija ± Sd No. of sclerotia ± Sd
J 3	23.5 ± 0.6 efg*	10.3 ± 5.5 gh
J 15	22.5 ± 3.4 g	13.3 ± 2.3 gh
J 20	29.3 ± 0.5 a	40.3 ± 4.2 c
J 32	25.6 ± 2.5 bcd	71.3 ± 11.3 b
M 47	26.8 ± 1.0 b	11.3 ± 3.8 gh
M 49	22.7 ± 1.1 fg	36.0 ± 3.5 cd
M 50	18.7 ± 1.3 hi	29.3 ± 15.3 def
V 66	24.3 ± 1.5 def	82.7 ± 1.5 a
V 68	24.1 ± 1.6 defg	86.0 ± 5.6 a
V 71	26.1 ± 1.9 bc	71.3 ± 2.3 b
V 75	19.3 ± 1.3 hi	36.3 ± 10.8 cd
S 102	20.1 ± 1.4 h	7.7 ± 6.4 hi
S 108	25.1 ± 1.3 bcde	19.7 ± 3.5 fgh
S 125	23.7 ± 2.3 efg	0.0 ± 0.0 i
J 3f	16.1 ± 0.7 j	8.6 ± 1.7 hi
J 15f	18.3 ± 2.3 i	13.0 ± 8.9 gh
M 47f	13.1 ± 2.2 k	4.0 ± 2.0 hi
M 49f	24.7 ± 1.9 cde	30.3 ± 3.5 cde
S 125f	14.6 ± 0.6 jk	24.7 ± 5.5 ef

J = Jagoda; M = Malina; V = Vinova loza; S = Salata; f = Laboratorijski dobijeni rezistentni izolati
 Sd = Standardna devijacija;

*Ista slova označavaju da se vrednosti ne razlikuju na nivou $p = 0.05$
 (F za porast = 48.6; $LSD_{0.05;133} = 1.7$; F za sklerocije = 55.2; $LSD_{0.05;38} = 10.6$)

J = Strawberry; M = Raspberry; V = Vine; S = Lettuce; f = Resistant isolate obtained in the laboratory
 Sd = Standard Deviation.

*Mean values followed by the same sletters are not significantly different ($p = 0.05$)
 (F for growth rate = 48.6; $LSD_{0.05;133} = 1.7$; F for sclerotial production = 55.2; $LSD_{0.05;38} = 10.6$)

li (Tabela 13). Izolati normalne osetljivosti nisu ostvarili infekciju na listovima suncokreta u prisustvu iprodiona. Intenzitet oboljenja koje su prouzrokovali izolati J 3f i J 15f u prisustvu fungicida bio je isti kao u kontroli (Tabela 13). Izolati M 49f i S 125f su prouzrokovali simptome slabijeg intenziteta u prisustvu fungicida u odnosu na kontrolu. Suprotno, izolat M 47f je bio infektivniji u prisustvu fungicida nego u kontroli (Tabela 13).

DISKUSIJA

Svi laboratorijski dobijeni sojevi *B. cinerea*, rezistentni na iprodion, bili su rezistentni i na vinklozolin, dok su diskriminativne koncentracije benomila i prohloraza u podlozi potpuno inhibirale rast ovih izolata. U poređenju sa sojevima normalne osetljivosti, svi rezisten-

tni sojevi rasli su sporije na KDA podlozi bez fungicida (Tabela 3). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora. Tako, Hisada i saradnici (1979) navode da rezistentni sojevi rastu sporije od osetljivih, bez obzira da li je u hranljivu podlogu dodat fungicid ili ne. Naši laboratorijski rezistentni sojevi M 49f i S 125f, kao i sojevi koje su dobili Summers i saradnici (1984) rastu brže na podlozi bez fungicida. Davis i Dennis (1979; loc cit. Gouot, 1994), Gullino i Garibaldi (1981) i Katan (1982; loc cit. Gouot, 1994) su čak zabeležili stimulativno delovanje fungicida u podlozi na porast rezistentnih izolata. Niko od navedenih autora nije pokušao da objasni prirodu ove pojave.

Rezistentni sojevi *B. cinerea* su bili slabije patogeni za plod jabuke od sojeva normalne osetljivosti. Izuzetak je bio soj M 49f koji se po patogenosti nije razlikovao od izvornog soja M 49 (Slike 1-3). U literaturi postoje različiti rezultati ispitivanja patogenosti laboratorijski dobi-

Tabela 13. Provera rezistentnosti f izolata *B. cinerea* *in vivo* inokulacijom primarnih listova suncokreta u prisustvu iprodiona
Table 13. Assessment of resistance of the f isolates of *B. cinerea* *in vivo* by inoculation of sunflower leaves in the presence of iprodione

Izolot Isolate	Vizuelna ocena intenziteta oboljenja – Visual assessment of disease intensity	
	Iprodion – Iprodione (10 mg/L)	Kontrola – Control (destilovana voda – distilled water)
J 3	-	+++
J 3f	++	++
J 15	-	+++
J 15f	++	++
M 47	-	++
M 47f	++	+
M 49	-	+++
M 49f	++	+++
S 125	-	++
S 125f	++	+++

J = Jagoda; M = Malina; S = Salata; f = Laboratorijski dobijeni rezistentni izolati

+++ = Visok intenzitet oboljenja – trulež zahvata više od 60% površine listova

++ = Srednji intenzitet oboljenja – trulež zahvata od 20% do 60% površine listova

+ = Nizak intenzitet oboljenja – trulež zahvata do 20% površine listova

- = Potpuno zdravi listovi

J = Strawberry; M = Raspberry; S = Lettuce; f = Resistant isolate obtained in the laboratory

+++ = High disease severity – more than 60% of leaf area diseased

++ = Moderate disease severity – 20 - 60% of leaf area diseased

+ = Low disease severity – less than 20% of leaf area diseased

- = No infection – healthy leaves

jenih rezistentnih sojeva. Po Gouot-u (1994), rezistentni sojevi su, po pravilu, slabije patogeni od odgovarajućih sojeva normalne osetljivosti. Slično zaključuju i Lorenz i Pommer (1985; loc. cit. Pommer i Lorenz, 1995) nakon proučavanja patogenosti 43 laboratorijski dobijena soja *B. cinerea* visoke rezistentnosti na dikarboksimide. U 20 slučajeva sojevi su izgubili patogenost kada su postali rezistentni, a u 23 slučaja je patogenost na kotiledonima krastavca bila značajno slabija u odnosu na sojeve normalne osetljivosti. Međutim, slično izolatu M 49f proučavanom u ovom radu, uočeno je da rezistentni sojevi mogu da budu patogeni kao i osetljivi (Slika 5) (Lorenz i Eichhorn, 1978).

Uočene su razlike u izgledu i brzini rasta micelije osetljivih izolata iz prirodnih populacija i laboratorijski dobijenih rezistentnih sojeva *B. cinerea*. Rezistentni sojevi, za razliku od osetljivih, posle deset do dvanaest dana razvoja na podlozi koja sadrži iprodion, počinju da luče smeđi pigment. Ovaj pigment se pojavljuje i tokom nekoliko presejavanja ovih izolata na podlogu bez fungicida. Slične razlike u morfološkim karakteristikama osetljivih i visokorezistentnih izolata *B. cinerea* primećili su Grindle (1979), Di Lena i saradnici (1981), Leone (1990), Movahedi i Heale (1990) i Gouot (1994), dok

Faretra i Pollastro (1993) navode da rezistentni izolati mogu da luče smeđi pigment u podlogu.

Razlike između osetljivih i rezistentnih izolata u izgledu hifa, konidija i sklerocija nisu uočene. Građa i oblik ovih tvorevina su u potpunosti odgovarali opisu Ellis-a i Waller-a (1974, loc. cit. Anonymous, 2001) i Cooley-Smith-a (1980, loc. cit. Anonymous, 2001).

Fijalokonidiofore i fijalokonidije u nizovima su bile prisutne u kulturama svih proučavanih izolata. U kulturama rezistentnih sojeva primećene su velike grupe fijalokonidija u zaštitnom omotaču, kao i spermadohije u „praznim” ćelijama hifa. Prema Urbasch-u (1984, loc. cit. Anonymous, 2001) loptaste, smeđe tvorevine sa 1000 do 3000 fijalokonidija nastaju posle dugog perioda rasta u nepovoljnim uslovima.

I osetljivi i rezistentni izolati su najbolje rasli na malt i KDA podlozi a najslabije na vodenom agaru (Tabela 4). Prema rezultatima Faretra-e i Grindle-a (1992, loc. cit. Anonymous, 2001) micelija *B. cinerea* raste dobro na različitim prirodnim i veštačkim podlogama. Oni smatraju da su KDA podloga i podloga od malta veoma pogodna za rast izolata i formiranje sklerocija. Pollastro i saradnici (1996) navode da je KDA podloga pogodnija za rast izolata od malt podloge. Prema našim rezul-

tatima, porast izolata na ove dve podloge se ne razlikuje statistički značajno na nivou verovatnoće 0.05 (Tabele 4 i 5).

Nije zabeležena razlika između osetljivih i rezistentnih izolata u pogledu optimalnih vrednosti za kiselost podloge i temperaturu. Statistička analiza je, međutim, pokazala da variranje temperature i kiselosti podloge ima izraženiji uticaj na porast osetljivih izolata (Tabele 6-9) u odnosu na rezistentne. Naime, i osetljivi i rezistentni izolati najsporije rastu pri pH 9, pri čemu se porast rezistentnih izolata na ovoj podlozi ne razlikuje od porasta na podlogama pH 7 i pH 8 (Tabele 6 i 7). Slična pojava je zabeležena i za temperaturu. Utvrđeno je da svi proučavani izolati najbolje rastu na temperaturi od 20°C, što je u skladu sa navodima Jarvis-a (1962, loc. cit. Anonymous, 2001), a da je porast najslabiji na temperaturi od 10°C. Međutim, porast rezistentnih izolata na ovoj temperaturi se ne razlikuje statistički značajno od porasta na temperaturi od 30°C (Tabele 8 i 9), dok je ova razlika u slučaju osetljivih izolata značajna.

Osetljivi izolati *B. cinerea* prosečno brže rastu nego rezistentni izolati, mada postoje izuzeci. Tako se prosečan porast micelije osetljivog soja S 108 značajno ne razlikuje od porasta micelije rezistentnog soja M 49f. Nema razlike ni u porastu osetljivih sojeva V 75 i M 50 i rezistentnog soja J 15f (Tabela 12). Brži porast osetljivih izolata kao pravilo konstatuju i Pollastro i saradnici (1996) i Chardonnet i saradnici (2000).

Razlike između izolata, kako u brzini rasta tako i u broju formiranih sklerocija, bile su statistički značajne na nivou verovatnoće 0,05. Međutim, korelacija između broja formiranih sklerocija i parametara osetljivosti izolata na iprodion i vinklozolin nije utvrđena (Tabela 12). Latorre i saradnici (2002) su konstatovali da se izolati *B. cinerea* značajno razlikuju u brzini rasta i broju stvorenih sklerocija. Mišljenja o broju sklerocija koje formiraju izolati rezistentni na dikarboksimide su podeljena. Gouot (1994) smatra da rezistentni izolati *B. cinerea* formiraju više sklerocija *in vitro* nego osetljivi. Međutim, broj formiranih sklerocija rezistentnih izolata, proučavanih u radu Pollastro-a i saradnika (1996), bio je manji u odnosu na broj sklerocija koje su formirali osetljivi izolati. Naši rezultati se delimično slažu sa navodima Pollastro-a i saradnika (1996). Četiri od pet proučavanih rezistentnih izolata *B. cinerea* obrazuju statistički značajno manji broj sklerocija nego osetljivi izolati od kojih su dobijeni (Tabela 12). Samo rezistentni soj S 125f formira više sklerocija od odgovarajućeg osetljivog izolata S 125.

Utvrđena je visoka negativna korelacija između brzine rasta izolata i rezistentnosti na dikarboksimide što potvrđuje navode Hisada-e i saradnika (1979), Gouot-a (1994) i Lorenz-a i Pommer-a (1985; loc. cit. Pommer i Lorenz, 1995) da postoji veza između brzine rasta izolata *B. cinerea* i osetljivosti na dikarboksimide.

Koeficijenti korelacije između osetljivosti izolata *B. cinerea* na povećan osmotski pritisak i rezistentnosti na iprodion i vinklozolin bili su takođe visokoznačajni i negativni. Beever i Brien (1983), Lorenz i Pommer (1985; loc. cit. Pommer i Lorenz, 1995) smatraju da su izolati, rezistentni na dikarboksimide, osetljiviji na osmotski stres od izolata normalne osetljivosti. Faretra i Pollastro (1991) su utvrdili da veza između osmoosetljivosti i rezistentnosti na dikarboksimide postoji ali korelacija nije uvek jasno uočljiva zbog visoke varijabilnosti vrste *B. cinerea*. Ipak, Fujimura i saradnici (2000) su pronašli korelaciju između rezistentnosti na iprodion i osetljivosti na povećanje osmotskog pritiska.

Svi rezistentni laboratorijski sojevi *B. cinerea* ostvaruju infekciju listova suncokreta u prisustvu iprodiona dok je zaraza osetljivim sojevima potpuno sprečena (Tabela 13). Naši rezultati se ne slažu sa rezultatima sličnog oglada koji su izveli Elad i saradnici (1992). Oni su rezistentnim i osetljivim izolatima *B. cinerea* inokulisali kotiledone listove krastavca, prethodno tretirane iprodionom koncentracije 5 mg/L. Pored očekivane zaraze rezistentnim izolatima u prisustvu fungicida, simptomi su se pojavili i na listovima inokulisanim nekim od osetljivih izolata u prisustvu fungicida. Autori ovakav ishod pripisuju heterokarionskoj prirodi vrste *B. cinerea* bez detaljnijeg objašnjenja. Naš eksperiment pokazuje da homogena koncentracija iprodiona na površini listova suncokreta sprečava infekciju osetljivim izolatima. Prema našim rezultatima (Tanović i sar., neobjavljeni podaci) koncentracija iprodiona od 5 mg/L dovoljna je da potpuno inhibira porast osetljivih izolata *B. cinerea*, *in vitro*. Pretpostavljamo da je način primene iprodiona (prskanje) u ogledu Elad-a i saradnika (1992) izazvao efekat koji smo mi dobili kada smo obezbedili rastuću koncentraciju fungicida u hranljivoj podlozi difuzijom sa trake filter-papira. Moguće je da bi uporedni ogled sa oba opisana načina primene fungicida iste koncentracije pokazao da li je način primene fungicida izazvao ove razlike, što ostaje zadatak za buduća istraživanja.

Proučavanje bioloških karakteristika izolata različite osetljivosti na dikarboksimide pokazuje da ova vrsta ima veoma izraženu varijabilnost i visok genetički potencijal za prilagođavanje selektivnom pritisku fungicida.

Naime, utvrđeno je da rezistentni izolati mogu da rastu brzo kao osetljivi, mogu da budu patogeni kao i osetljivi, kao i da mogu da ostvare infekciju u prisustvu fungicida, što potvrđuje zahtev za obaveznu primenu mera upravljanja rezistentnošću.

ZAHVALNOST

Autor zahvaljuje prof. dr Mirku Ivanoviću, prof. dr Branki Krstić i doc. dr Aleksandri Bulajić na korisnim sugestijama pri pisanju rada.

LITERATURA

- Anonymous*: Crop Protection Compendium. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK, 2001.
- Beever, R.E. and Brien, H.M.R.**: A survey of resistance to the dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea*. N.Z.J. Agric. Res., 26: 391-400, 1983.
- Chardonnet, C.O., Sams, C.E., Trigiano, R.N. and Conway, W.S.**: Variability of Three Isolates of *Botrytis cinerea* Affects the Inhibitory Effects of Calcium on this Fungus. Phytopathology, 90: 769-774, 2000.
- Charabany, G. and Shtienberg, D.**: Epidemiology of *Botrytis cinerea* in Sweet Basil and Implications for Disease Management. Plant Dis., 83: 554-560, 1999.
- Davis, R.P. and Dennis, C.**: Properties of dicarboximide resistant strains of *Botrytis cinerea*. Pesticide Sci., 12: 521-535, 1981.
- De Waard, M.A. and Nistelrooy, J.G.M.**: Antagonistic and Synergistic Activities of Various Chemicals on the Toxicity of Fenarimol to *Aspergillus nidulans*. Pestic. Sci., 13: 279-286, 1982.
- Dhingra, O.D. and Sinclair, J.B.**: Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA, 1995, p. 359.
- Di Lena, P., Marciano, P. and Magro, P.**: Comparative investigation on morphological and physiological features of three isolates of *Botrytis cinerea*. Phitopathol. Z., 100: 203-211, 1981.
- Elad, Y., Yunis, H. and Katan, T.**: Multiple fungicide resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. Plant Pathol., 41: 41-46, 1992.
- Faretra, F. and Pollastro, S.**: Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). Mycol. Res., 95(8): 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 Pathol., 41(1): 48-57, 1993.
- Fujimura, M., Ochiai, N., Ishiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K. and Yamaguchi, I.**: Fungicide Resistance and Osmotic Stress Sensitivity in *os* Mutants of *Neurospora crassa*. Pestic. Biochem. Physiol., 67: 125-133, 2000.
- 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.
- Grindle, M.**: Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. J. Gen. Microbiol., 111: 109-120, 1979.
- Guout, J.M.**: Characteristics and Population Dynamics of *Botrytis cinerea* and Other Pathogens Resistant to Dicarboximides. In: Fungicide Resistance in North America (Delp, C.J. ed.). The American Phytopathological Society, St. Paul, MIN, USA, 1994, pp. 53-55.
- Gullino, M.L. and Garibaldi, A.**: Biological properties of dicarboximide – resistant strains of *Botrytis cinerea*. Phytopathol. Mediterr., 20: 117-122, 1981.
- Hisada, Y., Takaki, H., Kawase, Y. and Ozaki, T.**: Difference in the potential of *Botrytis cinerea* to develop resistance to prosymidone *in vitro* and in field. Ann. Phitopathol. Soc. Jpn., 45: 283-290, 1979.
- Knight, S.C., Anthony, V.M., Brady, A.M., Greenland, A.J., Heaney, S.P., Murray, D.C., Powell, K.A., Schulz, M.A., Spinks, C.A., Worthington, P.A. and Youle, D.**: Rationale and perspectives on the development of fungicides. Ann. Rev. Phytopathol., 35: 349-372, 1997.
- LaMondia, J.A. and Douglas, S.M.**: Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut Greenhouses to Benzimidazole and Dicarboximide Fungicides. Plant Dis., 81(7): 729-732, 1997.
- Latorre, B.A., Spadaro, I. and Rioja, M.E.**: Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. Crop Protect., 21: 957-961, 2002.
- Leone, G.**: *In vivo* and *in vitro* phosphate-dependent polygalacturonase production by different isolates of *Botrytis cinerea*. Mycol. Res., 94: 1039-1045, 1990.
- Leroux, P. and Gredt, M.**: Resistance to Fungicides which Inhibit Ergosterol Biosynthesis in Laboratory Strains of *Botrytis cinerea* and *Ustilago maydis*. Pestic. Sci., 15: 85-89, 1984.
- 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 Bull., 21: 341-345, 1991.
- Lorenz, D.H. and Eichhorn, K.W.:** Untersuchungen zur möglichen resistenzbildung von *Botrytis cinerea* an rebengegen die wirkstoffe Vinclozolin und Iprodione. Die Wein-Wissensch., 33: 2-10, 1978.
- Lorenz, D.H. and Eichhorn, K.W.:** Vorkommen und Verbreitung der Resistenz von *Botrytis cinerea* gegen Dicarboximid-Fungizide im Anbaugebiet der Rheinpfalz. Die Wein-Wissensch., 35: 199-210, 1980.
- Lorenz, G.:** Dicarboximide Fungicides: History of Resistance Development and Monitoring Methods. In: Fungicide Resistance in North America (C.J. Delp, ed.). The American Phytopathological Society, St. Paul, MIN, USA, 1994, pp. 45-51.
- Movahedi, S. and Heale, J.B.:** The roles of aspartic proteinase and endopeptin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex Pers. Physiol. Mol. Pathol., 36: 303-324, 1990.
- Muntanjola-Cvetković, M.:** Opšta mikologija. NIRO Književne novine, Beograd, 1987.
- Murakoshi, S. and Hosaya, S.:** Occurrence of *Botrytis cinerea* resistant to iprodione in tomato fields. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 48: 547-550, 1982.
- Pappas, A.C. and Fisher, D.J.:** A Comparison of the Mechanisms of Action of Vinclozolin, Procymidone, Iprodione and Prochloraz against *Botrytis cinerea*. Pest. Sci., 10: 239-246, 1979.
- Pollastro, S., Faretra, F., Santomauro, A., Miazzi, M. and Natale, P.:** Studies on pleiotropic effects of mating type, benzimidazole-resistance and dicarboximide resistance genes in near-isogenic strains of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). Phytopath. Medit., 35: 48-57, 1996.
- Pommer, E.H. and Lorenz, G.:** Dicarboximide fungicides. In: Modern Selective Fungicides – Properties, Applications, Mechanisms of Action (H. Lyr, ed.). Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany, 1995, pp. 98-118.
- Rajković, S.:** Rezistentnost *Botrytis cinerea* Pers. prema nekim fungicidima koji se koriste za zaštitu vinove loze. Magistarska teza. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, 1992.
- Raposo, R., Gomez, V., Urrutia, T. and Melgarejo, P.:** Fitness of *Botrytis cinerea* Associated with Dicarboximide Resistance. Phytopathol., 90(11): 1246-1249, 2000.
- Rosslenbroich, H.J. and Stuebler, D.:** *Botrytis cinerea* – history of chemical control and novel fungicides for its management. Crop Protect., 19: 557-561, 2000.
- Sprengler, G., Scherer, M. and Pommer, E.H.:** Untersuchungen über das Resistenzverhalten von gegenüber Vinclozolin. Mitt. Biol. Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, Germany, 191: 236, 1979.
- Steel, C.C. and Nair, N.G.:** The Physiological Basis of Resistance to the Dicarboximide Fungicide Iprodione in *Botrytis cinerea*. Pestic. Biochem. Physiol., 15: 222-233, 1993.
- Stehmann, C.:** Biological activity of triazole fungicides towards *Botrytis cinerea*. Ponsen & Looine, Wageningen, The Netherlands, 1995, pp. 3-28.
- Summers, R.W., Heaney, S.P. and Grindle, M.:** Studies of a dicarboximide resistant heterokaryon on *Botrytis cinerea*. Proc. of BCPC, Brighton, UK, 1984, pp. 453-458.
- Tanović, B.:** Osetljivost izolata *Botrytis cinerea* Pers. iz različitih domaćina na dikarboksimide. Pesticidi, 18: 223-236, 2003.
- Tanović, B.:** Dobijanje laboratorijskih sojeva *Botrytis cinerea* Pers. rezistentnih na dikarboksimide crossed-paper metodom. Pesticidi: 19, 39-53, 2004.
- Van der Vlugt-Bergmans, C.J.B.:** Genetic variation and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. Proefschrift Wageningen.-Met lit. opg. Met samenvatting in het, The Netherlands, 1996.
- Verhoeff, K.:** Spotting of tomato fruits caused by *Botrytis cinerea*. Neth. J. Plant Pathol., 76: 219-226, 1970.
- Wang, Z.N., Coley-Smith, J.R. and Wareing, P.W.:** Dicarboximide Resistance in *Botrytis cinerea* in protected lettuce. Plant Pathol., 35: 427-433, 1986.
- Yourman, L.F. and Jeffers, S.N.:** Resistance to Benzimidazole and Dicarboximide Fungicides in Greenhouse Isolates of *Botrytis cinerea*. Plant Dis., 83(6): 569-575, 1999.
- Yourman, L.F., Jeffers, S.N. and Dean, R.A.:** Genetic Analysis of Isolates of *Botrytis cinerea* Sensitive and Resistant to Benzimidazole and Dicarboximide Fungicides. Phytopathology, 90: 581-589, 2000.

Biological Traits of *Botrytis cinerea* Pers. Isolates Differently Sensitive to Dicarboximides

SUMMARY

A study of biological characteristics of both field and laboratory isolates revealed that highly resistant isolates were morphologically different from their original wild types. The majority of them were less pathogenic and produced less sclerotia than the original ones. Significant negative correlation between osmotic sensitivity and the degree of resistance was recorded. The correlation between micelium growth rate and resistance to dicarboximides was also significant and negative. Growth medium, acidity and growth temperature had less effect on the micelium growth rate of the highly resistant isolates than on the sensitive ones.

Keywords: *Botrytis cinerea*; Dicarboximides; Resistance; Osmotic sensitivity; Iprodione; Vinclozolin