

## ODPORNOST SIVE PLESNI (*Botrytis* sp.) PROTI FUNGICIDOM V SLOVENSКИH NASADIH JAGOD

Neja MAROLT<sup>1</sup>, Metka ŽERJAV<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana

### IZVLEČEK

Pri pridelovanju jagod je siva plesen (*Botrytis* sp.) najbolj pogost vzrok gnitja plodov, tako v nasadih kot po obiranju. Večina pridelovalcev jagod fungicide nanaša večkrat v rastni dobi. Preprečevanje boleznih v nasadih jagod v Evropi je postalo težje zaradi pojavljanja sevov glive, ki so hkrati odporni na več aktivnih snovi iz različnih kemijskih skupin in z različnimi načini delovanja. Želeli smo ugotoviti, ali je ta pojav značilen tudi za nasade pri nas. V maju in juniju 2018 smo pregledali sedem intenzivnih nasadov jagod in en nasad z ekološko pridelavo. V vsakem nasadu smo vzeli pet vzorcev okuženih plodov in pripravili skupno 40 izolatov glive v čisti kulturi. Odpornost proti fludioksonilu (FDL) in ciprodinilu (CDL) smo določali z merjenjem prirasta gliv v mikrotitrskih ploščah v tekočem gojišču z dodatkom fungicidov različnih koncentracij, vpliv fenheksamida (FH) pa smo ocenjevali z merjenjem dolžine hif pri kalitvi trosov glive. S Probit analizo smo izračunali koncentracijo EC<sub>50</sub>, pri kateri fungicid zavre rast glive za 50 %. Odpornost proti CDL je bila ugotovljena v vseh nasadih, razen pri ekološki pridelavi. Od 40 analiziranih izolatov je bilo 23 odpornih in 4 srednje odporni, štirje nasadi so bili brez izolatov občutljivih za CDL. Proti FDL je bila odporna ali srednje odporna polovica izolatov (19 od 38), v enem nasadu so bili takšni vsi. Odpornost ali srednje odpornost proti CDL in FDL hkrati smo izmerili pri 19 izolatih iz sedmih nasadov, 16 od teh je bilo odpornih tudi proti FH. V enem od nasadov so bili vsi izolati odporni proti vsem trem aktivnim snovem. Hkratna odpornost proti več aktivnim snovem je torej pogosta tudi v Sloveniji zato ta pojav zahteva skrbno načrtovanje in omejitev rabe fungicidov in bolj dosledno izvajanje nekemičnih ukrepov za preprečevanje širjenja sive plesni, vključno z uporabo biotičnih pripravkov.

**Ključne besede:** siva plesen, *Botrytis* sp., odpornost, fungicidi, nasadi jagod, Slovenija

### ABSTRACT

#### RESISTANCE OF GRAY MOLD (*Botrytis* sp.) STRAINS TO FUNGICIDES IN STRAWBERRY FIELDS IN SLOVENIA

---

<sup>1</sup> mag. inž. hort., Hacquetova ulica 17, SI-1000-Ljubljana, e-pošta: neja.marolt@kis.si

<sup>2</sup> mag. agr. znan., prav tam

Gray mold (*Botrytis* sp.) is a major pathogen in strawberry production, causing severe yield losses before and after harvesting. Fungicides against *Botrytis* are commonly applied several times per season. Disease control in European strawberry fields has become difficult due to distribution of strains resistant to more active ingredients from different chemical classes with different modes of action. Strawberry fields in Slovenia were examined to find out whether such strains occur. In May and June 2018 infected fruits were sampled in seven fields with integrated production and in one field with organically grown strawberries. Five samples were collected from each field and 40 isolates in pure culture were obtained. Resistance to fludioxonil (FDL) and cyprodinil (CDL) was analysed with microtiter plate assay, where fungal growth of isolates at different concentrations of fungicides was measured. Resistance to fenhexamid (FH) was evaluated by measuring germ tube length of spores on agar plates. The concentration at which fungal growth was inhibited by 50% (EC<sub>50</sub>) was calculated with probit analysis. In all fields except the field with organic production, resistance to CDL was detected. Out of 40 isolates there were 23 resistant and four intermediately resistant to CDL. In four fields no isolates sensitive to CDL were found. Half of tested isolates (19 out of 38) were resistant or intermediately resistant to FDL and in one field no sensitive strains were detected. Resistance or intermediate resistance to both CDL and FDL was measured for 19 isolates from seven fields and 16 of them were resistant also to FH. In one field all tested isolates were resistant or intermediately resistant to all three active ingredients. *Botrytis* strains with resistance to more active ingredients were found to be distributed in Slovenian strawberry fields, therefore careful planning of the fungicide use is required. Preventive control measures need to be implemented, including biological control of grey mould.

**Key words:** grey mould, *Botrytis* sp., resistance, fungicides, strawberry fields, Slovenia

## 1 UVOD

Siva plesen (*Botrytis* sp.) je eden izmed najpogostejših vzrokov gnitja plodov jagod, drugih jagodičastih sadnih vrst, vrtnin in okrasnih rastlin. Na jagodah se pojavljata vrsti *Botrytis cinerea*, ter novo opisana vrsta *B. fragariae*, ki je bolj specializirana za tkiva jagodnjaka, redkeje pa vrsta *B. pseudocinerea* (Weber in Hahn, 2019; Rupp in sod., 2017a). Za doseganje visoko kakovostnih plodov jagod, po kateri povprašuje današnji potrošnik, je skrb za zdravstveno varstvo nasadov pred boleznimi ključnega pomena. Večina pridelovalcev jagod nanaša fungicide za zatiranja sive plesni večkrat v rastni dobi, od začetka cvetenja dalje. Pogosta raba sintetičnih fungicidov predstavlja velik selekcijski pritisk za glivo in s tem tveganje za pojav odpornosti proti fungicidom. Poročanja o zmanjšani občutljivosti glive *Botrytis* sp. na fungicide segajo že v 60. leta prejšnjega stoletja, kmalu po uvedbi fungicidov s specifičnim načinom delovanja (Hahn, 2014), vendar je po opustitvi rabe fungicidov z delovanjem na več mest v celici glive ta pojav postal izrazitejši. V zadnjem desetletju se vse pogosteje pojavljajo sevi glive *Botrytis* sp., ki so hkrati odporni proti več aktivnim snovem, zato postaja zatiranje sive plesni v Evropi (Španija, Nemčija, Italija) kot tudi širše (ZDA, Brazilija) manj učinkovito (Weber in Hahn, 2019; De Miccolis Angelini in sod., 2014; Fernández-Ortuño in sod., 2016; Pokorny in sod., 2016; Lopes in sod.,

2017). Pri nas so na zmanjšano učinkovitost fungicida z aktivnima snovema ciprodinil in fludioksonil začeli opozarjati pridelovalci jagod v Posavju v letu 2016.

O odpornosti ali rezistenci proti fungicidom govorimo, kadar ima gliva zmanjšano občutljivost na določeno aktivno snov in je ta lastnost dedna. Kadar v populaciji gliv delež osebkov z odpornostjo narašča, pride do praktičnih težav z učinkovitostjo uporabljenih fungicidov. Za doseganje učinka, kot ga sicer pričakujemo pri občutljivih sevih glive, bi v takem primeru potrebovali večjo koncentracijo fungicida ali pa delovanje na glivo sploh izostane tudi pri večjih koncentracijah. Na razvoj odpornosti vpliva več dejavnikov; poleg sposobnosti reprodukcije odpornih sevov glive še vrsta uporabljene aktivne snovi in njen način delovanja ter pogostost rabe fungicidov v rastni dobi (Brent in Hollomon, 2007; Hahn, 2014). Zaradi genetske pestrosti znotraj rodu *Botrytis*, lahko v enem samem nasadu jagod pričakujemo seve z različnimi tipi odpornosti. Gliva je lahko odporna na določeno aktivno snov zaradi mutacije na le enem mestu delovanja v celicah glive (target site resistance) ali na več aktivnih snovi, z enakim načinom delovanja (navzkrižna odpornost). Glive pa imajo lahko zmanjšano občutljivost tudi na aktivne snovi iz različnih kemijskih skupin in z različnim načinom delovanja in govorimo o multipli odpornosti (multi drug resistance, MDR) (Brent in Hollomon, 2007). Razvoj multiple odpornosti sevov sive plesni je pogostejši v nasadih jagod z intenzivnejšo pridelavo. Multipla odpornost lahko temelji na spremembi genov, ki regulirajo transport snovi v celici glive tako, da se poveča aktivno prečrpavanje skozi celično membrano in se celici tuje snovi, tudi aktivne snovi fungicidov, odstranjujejo iz celice. Ker ta mehanizem deluje enako za različne snovi, se odraža kot manjša občutljivost ali odpornost proti več aktivnim snovem. V jagodah sta pogosta fenotipa MDR1 in MDR1h, za katera je značilna hkratna zmanjšana občutljivost oziroma odpornost proti ciprodinilu in fludioksonilu (Hahn, 2014; Grabke in Stammeler, 2015; Rupp in sod., 2017), manj pogost pa je fenotip MDR2 s hkratno odpornostjo proti ciprodinilu, fenheksamidu in iprodionu (Hahn, 2014).

V Sloveniji je bilo v času raziskave registriranih osem različnih aktivnih snovi za zatiranje sive plesni (iprodion, fenpirazamin, pirimetanil, ciprodinil, fludioksonil, fenheksamid, piraklostrobin, boskalid) v sedmih komercialnih pripravkih, dva mikrobiotična pripravka osnovana na bakteriji *Bacillus subtilis* in en mikrobiotični pripravek na osnovi glive *Gliocladium catenulatum*. Po oceni tveganja za pojav odpornosti, ki jo predlaga FRAC je le za biotične pripravke tveganje nizko, za aktivne snovi fludioksonil, fenheksamid in fenpirazamin pa nizko do srednje. Za vse ostale aktivne snovi je tveganje srednje do visoko (FRAC, 2019).

## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1 Vzorčenje

V maju in juniju 2018 smo na različnih lokacijah Slovenije vzorčili plodove jagod okužene s sivo plesnijo. Za potrebe raziskave nismo razlikovali med vrstami znotraj rodu *Botrytis*. Pregledali smo osem nasadov jagod in sicer sedem intenzivnih nasadov (dva na Gorenjskem, štiri v Posavju in enega v Prekmurju) ter en nasad z ekološko

pridelavo v okolici Ljubljane. V vsakem nasadu smo vzeli 5 vzorcev okuženih plodov. Posamezen vzorec so sestavljali od dva do trije okuženi plodovi. Za nasade smo zbrali tudi podatke o starosti nasada in načinu varstva proti glivičnim boleznim.

## 2.2 Priprava izolatov sive plesni

Plodovi so se inkubirali pri sobni temperaturi, dokler ni bila vidna sporulacija. Trosonosce s konidiji smo z izbranega ploda posameznega vzorca prenesli na ploščo z grahovim gojiščem (16 % zmrznjen grah, 2 % agar, 0,5 % glukoza) in inkubirali pri 20 °C in 16 urni fotoperiodi. Po ponovnem precepljanju smo dobili čiste kulture. Skupno smo pripravili 40 izolatov glive *Botrytis* sp., ki smo jih do analize hranili na grahovem gojišču pri temperaturi 4–6 °C.

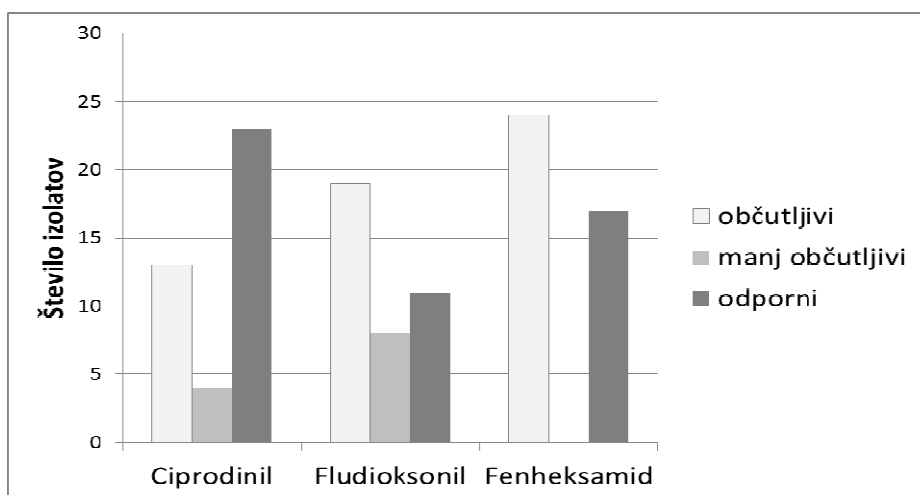
## 2.3 Preverjanje odpornosti sive plesni proti ciprodinilu (CDL), fludioksonilu (FDL) in fenheksamidu (FH) in kriteriji za razvrščanje izolatov

Odpornost proti CDL in FDL smo testirali z ugotavljanjem skupnega prirasta gliv v tekočem gojišču z želatino z dodatkom fungicidov v različnih koncentracijah na mikrotitrskih ploščah (FRAC, 2006). Uporabili smo kemijsko čisti aktivni snovi, analitska standarda Fludioxonil PESTANAL® in Cyprodinil PESTANAL®, Merck) v 11 različnih koncentracijah od 0,0005 mg/l do 5 mg/l. Intenziteto rasti glive smo merili s fotospektrometrom Tecan Sunrise™ z nastavitvijo pri OD 492 nm. Prvo merjenje je bilo izvedeno takoj po dodajanju suspenzije trosov fungicidu, drugo merjenje pa po 72 urah inkubacije. Iz razlik med obema odčitkom, smo izračunali inhibicijo rasti glive pri vsaki koncentraciji fungicida glede na kontrolo ter s pomočjo probit analize za vsak izolat izračunali koncentracijo EC<sub>50</sub> pri kateri posamezen fungicid zavre rast glive za 50 %. Odporne, srednje odporne in občutljive izolate na CDL in FDL smo razvrstili po kriteriju, kot so ga uporabili Scalliet in sod. (2017). Kadar so bile vrednosti EC<sub>50</sub> nižje od 0,1 mgL<sup>-1</sup> smo izolate razvrstili med občutljive; odporni izolati so imeli EC<sub>50</sub> vrednosti med 0,1 mgL<sup>-1</sup> in 1 mgL<sup>-1</sup>, pri vrednosti EC<sub>50</sub> večji od 1 mgL<sup>-1</sup> pa smo izolate razvrstili med odporne.

Odpornost proti FH smo ugotavljali z metodo povzeto po Webru in Hahnu (2011) tako, da smo merili dolžino hif pri kalitvi trosov glive na trdnem 1 % MAE gojišču z dodatkom fungicida Teldor® SC 500 (fenheksamid 42,74 %, Bayer) v 7 različnih koncentracijah od 0,01 mg/l do 100 mg/l. Dolžino kličnih hif smo merili po 12-14 urah inkubacije na 21 °C in popolni temi. S pomočjo diskriminatorskih koncentracij 1 mgL<sup>-1</sup> in 50 mgL<sup>-1</sup>, ki sta ju določila avtorja smo testirane izolate razvrstili med odporne, kadar so ti pri koncentraciji 1mgL<sup>-1</sup> neovirano rastle, pri 50 mgL<sup>-1</sup> pa so neovirano rastle ali pa je bila inhibicija rasti manjša od 50 %.

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

V letu 2018 smo analizirali 40 izolatov sive plesni na odpornost proti CDL, FDL in FH. Odpornost proti CDL je bila ugotovljena v sedmih nasadih. Od 40 analiziranih izolatov je bilo 23 odpornih in štirje manj občutljivi (srednje odporni). V štirih nasadih so bili vsi izolati odporni ali manj občutljivi za CDL. Proti FDL je bila odporna ali manj občutljiva polovica izolatov (19 od 38). Odpornost proti FDL je bila ugotovljena v šestih nasadih, v enem od teh ni bilo nobenega občutljivega izolata.



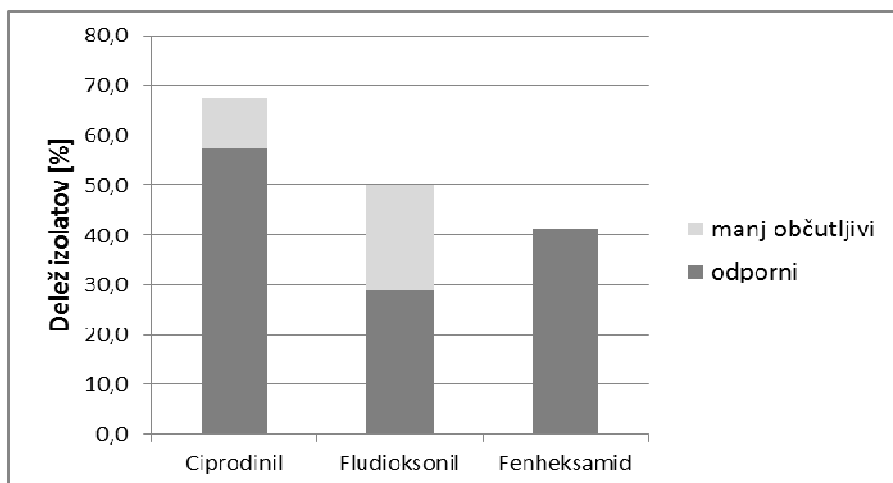
Slika 1: Število testiranih izolatov sive plesni (*Botrytis* sp.) odpornih proti ciprodinilu (CDL), fludioksonilu (FDL) in fenheksamidu (FH) v letu 2018.

256

Odpornost ali srednjo odpornost proti CDL in FDL hkrati smo izmerili pri 19 izolatih iz sedmih nasadov, hkratno odpornost pa pri devetih izolatih. Od 17 izolatov odpornih proti FH (navzoči v šestih nasadih) jih je bilo 16 hkrati tudi manj občutljivih ali odpornih proti CDL in FDL. Osem izolatov najdenih v štirih nasadih je bilo odpornih na vse tri aktivne snovi.

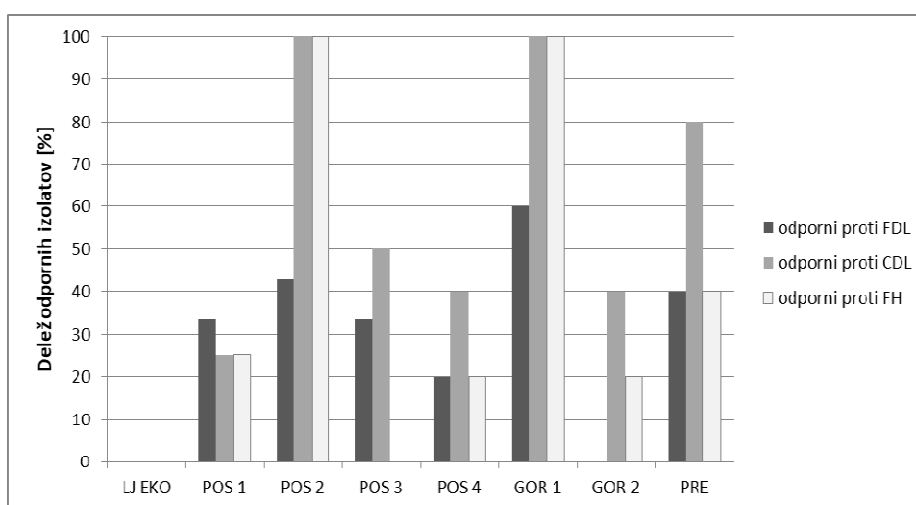
Delež odpornih izolatov proti CDL je v slovenskih nasadih jagod v letu 2018 znašal 57,7 %, delež odpornih proti FDL pa 28,9 %. Podobni monitoringi so se v letih med 2007 in 2015 izvajali v več evropskih državah in v povprečju je bilo odpornih proti CDL od 32 do 62 % izolatov, delež izolatov odpornih proti FDL pa je bil med evropskimi državami bolj variabilen, vendar je v povprečju presegal 10 % (Scalliet, 2017).

Pridelovalci so v obravnavanih nasadih od pripravkov, ki so v Sloveniji registrirani za varstvo proti sivi plesni, uporabljali vse uvodoma naštetе aktivne snovi razen biotičnih pripravkov. V rastni dobi so proti sivi plesni opravili od dva do štiri nanose fungicida. Število nasadov je bilo premajhno, da bi lahko ugotavljali povezavo med številom škropljenj in uporabljenimi pripravki ter intenzivnostjo pojava odpornosti. Kljub temu pa sklepamo, da je večje število škropljenj v istem nasadu povečalo delež odpornih izolatov, saj je bila odpornost bolj izražena v nasadih sajenih v letu 2016 (POS 2, GOR 1, PRE), ki so bili izpostavljeni fungicidom dve zaporedni rastni dobi. Odpornost proti vsem trem aktivnim snovem je bila ugotovljena v treh nasadih v Posavju (POS 1, POS 2, POS 4), enem na Gorenjskem (GOR 1) in v nasadu v Prekmurju (PRE). Zgolj v ekološkem nasadu v okolici Ljubljane, kjer niso uporabljali sintetičnih fungicidov so bili vsi testirani izolati občutljivi na CDL, FDL in FH.



Slika 2: Delež manj občutljivih in odpornih izolatov sive plesni proti CDL, FDL in FH v letu 2018.

257



Slika 3: Delež odpornih izolatov sive plesni proti FDL, CDL in FH v nasadih jagod v letu 2018 glede na lokacijo nasada (LJ EKO-Ljubljana, POS-Posavje, GOR-Gorenjska, PRE-Prekmurje).

#### 4 SKLEPI

Zmanjšana občutljivost in hkratna odpornost sive plesni (*Botrytis* sp.) proti več aktivnim snovem je pogosta tudi v Sloveniji, saj je bila tretjina analiziranih izolatov odporna ali manj občutljiva na tri ključne aktivne snovi, ki se uporabljajo za zatiranje sive plesni na jagodah. Predvidevamo, da gre vsaj pri nekaterih od teh izolatov za

pojavnost multiple odpornosti. Sklepamo, da so nekateri izolati z multiplo odpornostjo manj občutljivi ali odporni tudi na druge pogosto uporabljene aktivne snovi za zatiranje sive plesni jagod, za katere nismo opravili testiranja. Domnevamo, da so izolati odporni proti CDL iz skupine anilino-pirimidinov odporni tudi na pirimetanil, ki pripada isti kemijski skupini.

V dveletnih nasadih jagod z intenzivno pridelavo, ki vključuje od dve do štiri škropljenja proti sivi plesni jagod v rastni dobi, je bil delež odpornih izolatov največji. Razvoju odpornosti se ni mogoče povsem izogniti, vendar lahko njen pojav upočasnimo s skrbnim načrtovanjem rabe fungicidov, ki vsebujejo aktivne snovi z različnim načinom delovanja in pripadajo različnim kemijskim skupinam. V primeru multiple odpornosti je lahko ogroženo delovanje vseh zdaj registriranih fungicidov za zatiranje sive plesni. Zato je priporočljivo, poleg gojenja v zavarovanih prostorih, tudi dosledno izvajanje nekemičnih ukrepov za preprečevanje širjenja sive plesni, vključno s pravilno izbiro rastišča in gostoto sajenja, zmernim namakanjem in gnojenjem, uporabo biotičnih pripravkov ter sprotim odstranjevanjem okuženih plodov.

## 5 ZAHVALA

Avtorici se zahvaljujeva vsem pridelovalcem jagod, ki so prispevali vzorce za potrebe raziskave in Upravi RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, ki je financirala raziskavo v okviru strokovne naloge Integriranega varstva rastlin.

## 6 LITERATURA

- Brent, K., Hollomon, D. W. 2007a. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? 2<sup>nd</sup> revised edition. FRAC, Croplife international: 56 str.
- Brent, K., Hollomon, D. W. 2007b. Fungicide resistance: the assessment of risk. FRAC Monograph No. 2 second, (revised) edition: 53 str.
- De Miccolis Angelini, R. M., Rotolo, C., Masiello, M., Gerin, D., Pollastro, S., Faretra, F. 2014. Occurrence of fungicide resistance in populations of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on table grape and strawberry in southern Italy. *Pest management science* 70: 1785-1796
- Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Xingpeng, L., Schnabel, G. 2016a. Independent emergence of resistance to seven chemical classes of fungicides in *Botrytis cinerea*. *The American phytopathology society, Phytopathology* 105(4): 424-432
- Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., Chamorro, M., Pérez-García, A., De Vicente, A. 2016b. Characterization of resistance to six chemical classes of site-specific fungicides registered for gray mold control on strawberry in Spain. *Plant Disease* /Vol.100 No.11: 2234-2239
- FRAC. 2006. BOTRCI monitoring method Syngenta 2006 V1.
- FRAC. 2019. FRAC code list. Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action.
- Grabke, A., Fernández-Ortuño, D., Schnabel, G. 2013. Fenhexamid resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry fields in the Carolinas is associated with four target gene mutations. *The American phytopathology society, Plant disease* 97(2): 271-276
- Grabke, A., Stammler, G. 2015. A *Botrytis cinerea* population from a single strawberry field in Germany has a complex fungicide resistance pattern. *The American phytopathology society, Plant disease* 99(8): 1078-1086
- Hahn, M. 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of chemical biology* 7: 133-141
- Leroch, M., Plesken, C., Weber, R.W.S., Kauff, F., Scalliet, G., Hahn, M. 2013. Gray mold population in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by

- a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. Applied and environmental microbiology 79(1): 159-167
- Lopes, U. P., Zambolim, L., Capobianco, N. P., Osorio Gracia, N. A., Livramento Freitas-Lopes, R. 2017. Resistance of *Botrytis cinerea* to fungicides controlling gray mold on strawberry in Brazil. *Bragantia*, Campinas, v.76, n.2: 266-272
- Pokorny, A., Smilanick, J., Xiao, C. L., Farrar, J. J., Shrestha, A. 2016. Determination of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry in the Central coast region of California. The American phytopathology society, Plant health progress 17(1): 30-34
- Rupp, S., Weber, R.W.S., Rieger, D., Detzel, D., Hahn, M., 2017a. Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in German horticulture. *Journal frontiers in microbiology, antimicrobials, resistance and chemotherapy* 7: 12 str.
- Rupp, S., Plesken, C., Rumsey, S., Dowling, M., Schnabel, G., Weber, R.W.S., Hahn, M. 2017b. *Botrytis fragariae*, a new species causing gray mold of strawberries, shows high frequencies of specific and efflux-based fungicide resistance. *Applied and environmental microbiology* 83(9): 16 str.
- Russell, P. E. 2004. Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. FRAC Monograph No. 3: 56 str.
- Scalliet, G., Edel, D., Mosbach, A., Oostendrop, M., Camborde, F., Sierotzki, H. 2017. Learning from *Botrytis* monitoring after more than 20 years of Switch®. *Modern fungicides and antifungal compounds*, Vol. VIII: 147-152
- Weber, R.W.S. 2011. Resistance of *Botrytis cinerea* to multiple fungicides in Northern German small-fruit production. *The American phytopathology society, Plant disease* 95(10): 1263-1269
- Weber, R.W.S., Hahn, M. 2011. A rapid and simple method for determining fungicide resistance in *Botrytis*. *Journal of plant diseases and protection* 118 (1): 17-25
- Weber, R.W.S., Hahn, M. 2019. Grey mould disease of strawberry in northern Germany: causal agents, fungicide resistance and management strategies. *Applied microbiology and biotechnology* 103(4): 1589-1597