



Kmetijski inštitut Slovenije

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

Neja MAROLT, Metka ŽERJAV

14. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin  
Maribor, 6. marec 2019

# Odpornost sive plesni (*Botrytis* sp.) proti fungicidom

- Direktiva 2009/128/ES zajema **načelo o Antirezistentni strategiji**, ki temelji na uporabi FFS z različnim spektrom delovanja in upoštevanju drugih vidikov IVR, ki vplivajo na zmanjšanje pojavnosti bolezni in se s tem tudi zmanjša tveganje za pojav odpornosti.
- *Botrytis cinerea*, *Botrytis pseudocinerea*, *Botrytis fragariae*
- Siva plesen je organizem, ki hitro razvije odpornost proti fungicidom.
- Po l. 2010 se zlasti v nasadih jagod povečuje delež sevov *Botrytis*, ki so hkrati odporni proti več aktivnim snovem (ciprodinil, fludioksonil, fenheksamid, boskalid, trifloksistrobin).

# Odpornost sive plesni (*Botrytis* sp.) proti fungicidom

- Je posledica selekcijskega pritiska redkih a vedno navzočih mutantov glive, ki preživijo ob nanosu fungicida v nasadu in se nato širijo (proces poteče v nasadu, odporne seve pa lahko dobimo s sadikami ali iz bližnjih nasadov).
  - **Zmanjšana občutljivost ali toleranca:** manjši upad občutljivosti gliv, ki nima vpliva na praktično uporabo fungicida ali pa je ta majhen.
- Odpornost:** zmanjšanje občutljivosti posameznih sevov/izolatov gliv, ki v primeru, da se ti v populaciji patogena namnožijo, to bistveno vpliva na učinkovitost fungicida v praksi (Brent in Hollomon, 2007).
- **Kriterij za ugotavljanje odpornosti** je prvotna odpornost v populaciji glive (*baseline* EC<sub>50</sub>) pred začetkom rabe določenega fungicida ali primerjava z najbolj občutljivimi izolati glive na nekem območju (Scalliet et al., 2017 in Weber et al., 2011).

# Registrirani fungicidi za zatiranje sive plesni na jagodah

Pripravek	Aktivna snov	Skupina glede na način delovanja	Dovoljeno št. uporab	Tveganje za pojav odpornosti
Amylo-X, Serenade ASO	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	do 6x	majhno
Prestop	<i>Gliocladium catenulatum</i>	-	do 3x	-
Prolectus	fenpirazamin	amino-piralizanoni	do 3x	majhno do srednje
Pyrus 400 SC, Scala	pirimetanil	anilino-primidini	do 2x	srednje
Signum	boskalid + piraklostrobin	SDHI (karboksamidi) + QOL (strobilurini)	do 2x	veliko + srednje do veliko
Switch 62,5 WG	ciprodinil + fludioksonil	anilino-primidini + fenilpiroli	do 2x	srednje + majhno do srednje
Teldor SC 500	fenheksamid	hidroksianilidi	do 3x	majhno do srednje

FRAC Code list © 2018

# Materiali in metode

- **Vzorčenje:** na 8 lokacijah v maju in juniju 2018: 7 intenzivnih nasadov in 1 nasad z ekološko pridelavo, na vsaki lokaciji 5 podvorcev
- **V laboratoriju smo pripravili 40 izolatov v čisti kulturi** na gojišču z grahamom

## Testiranje odpornosti:

- **ciprodinil in fludioksonil:** FRAC metoda za testiranje odpornosti izolatov *Botrytis cinerea* na mikrotitrskih ploščah (Sierotzki & Edel 2005, Scalliet et al. 2017)
- **fenheksamid:** merjenje dolžine hif pri kalitvi trosov glive na gojišču v petrijevkah (Weber & Hahn, 2011)



# Ugotavljanje odpornosti proti ciprodinilu in fludioksonilu

- Priprava inokuloma:  $1 \times 10^6$  konidijev/ml
- Gojenje glive na mikrotitrskih ploščicah (96 celic) v tekočem gojišču z želatino z dodatkom fungicidov (fludioksonil in ciprodinili PESTANAL<sup>®</sup>, Merck): 11 koncentraciji od  $0,0005$ - $5 \text{ mgL}^{-1}$  in v gojišču brez fungicidov
- Mikrotitrške ploščice: 4 ponovitve za vsako koncentracijo fungicida za posamezen izolat
- Inkubacija pri  $20 \text{ °C}$  v temi
- Meritev rasti po 72 urah



# Ugotavljanje odpornosti proti ciprodinilu in fludioksonilu

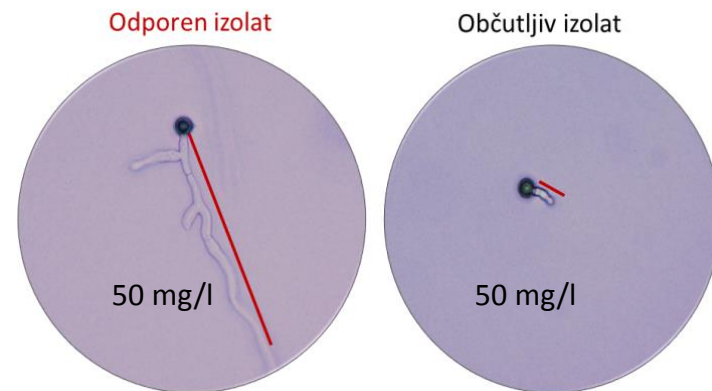
- **Fotospektrometer** – 492 nm
  1. **merjenje** takoj po dodajanju trosov fungicidu (0 ur)
  2. **merjenje** po 72 urah inkubacije
- Odčitek fotospektrometra je merilo intenzitete rasti v posamezni celici
- Izračunali smo inhibicijo rasti pri vsaki koncentraciji fungicida
- S probit analizo smo izračunali **EC<sub>50</sub>** (koncentracijo pri kateri fungicid zavre rast glive za 50 % za vsak posamezen izolat)
- Kriterij za razvrščanje izolatov po Scalliet et al. (2017)
  - občutljivi**  $EC_{50} < 0,1 \text{ mgL}^{-1}$
  - manj občutljivi (srednje odporni)**  $EC_{50} > 0,1 \text{ mgL}^{-1}$  in  $< 1 \text{ mgL}^{-1}$
  - odporni**  $EC_{50} > 1 \text{ mgL}^{-1}$



# Ugotavljanje odpornosti proti fenheksamidu

- **Priprava inokuluma:  $1-5 \times 10^5$  konidijev/ml**
- Priprava petrijevka z **1 % MEA gojiščem** z dodatkom fungicida **Teldor®SC 500** (fenheksamid 42,74 %, Bayer) v diskriminatornih koncentracijah 1 in 50 mgL<sup>-1</sup>
- 20 µl suspenzije trosov testiranega izolata smo razmazali po gojišču (2 ponovitvi z vsako koncentracijo fungicida)
- Merjenje dolžine kličnih hif po 12-14 urah na gojišču
- **Kriterij za razvrščanje izolatov** po Weber & Hahn (2011)  
primerjava z rastjo na gojišču brez fungicida:

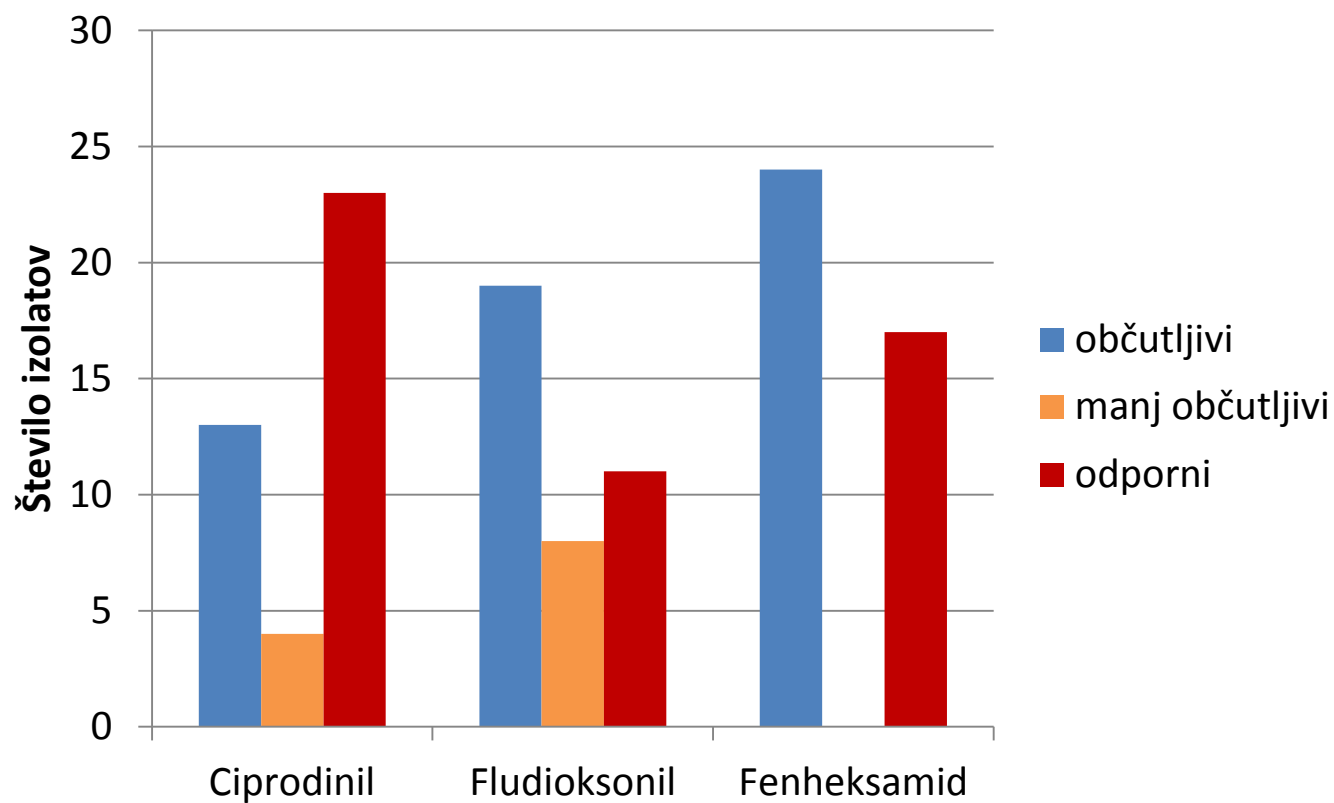
**Odporen izolat** pri 1 mgL<sup>-1</sup> neovirano raste,  
pri 50 mgL<sup>-1</sup> pa neovirano raste ali je inhibicija  
manjša od 50 %.





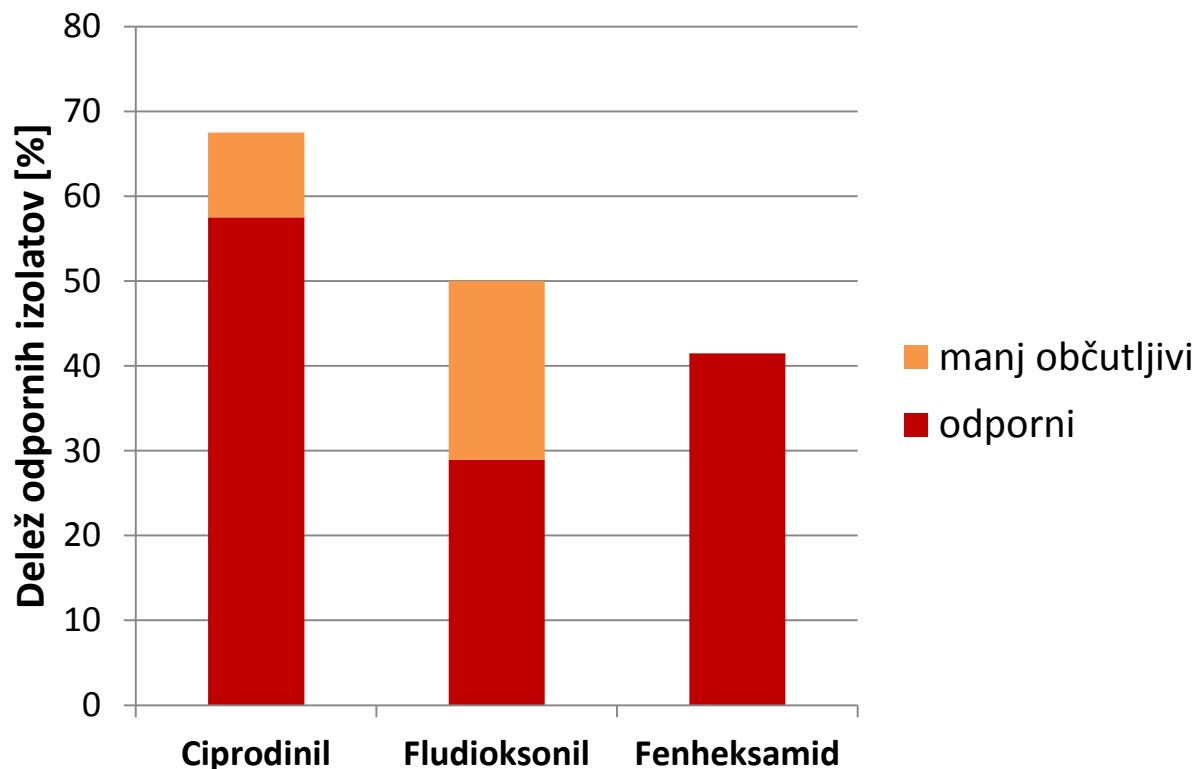
# Rezultati

Število občutljivih, manj občutljivih in odpornih izolatov sive plesni proti ciprodinilu, fludioksonilu in fenheksamidu



# Rezultati

Delež **manj občutljivih** in **odpornih** izolatov sive plesni v Sloveniji glede na aktivno snov



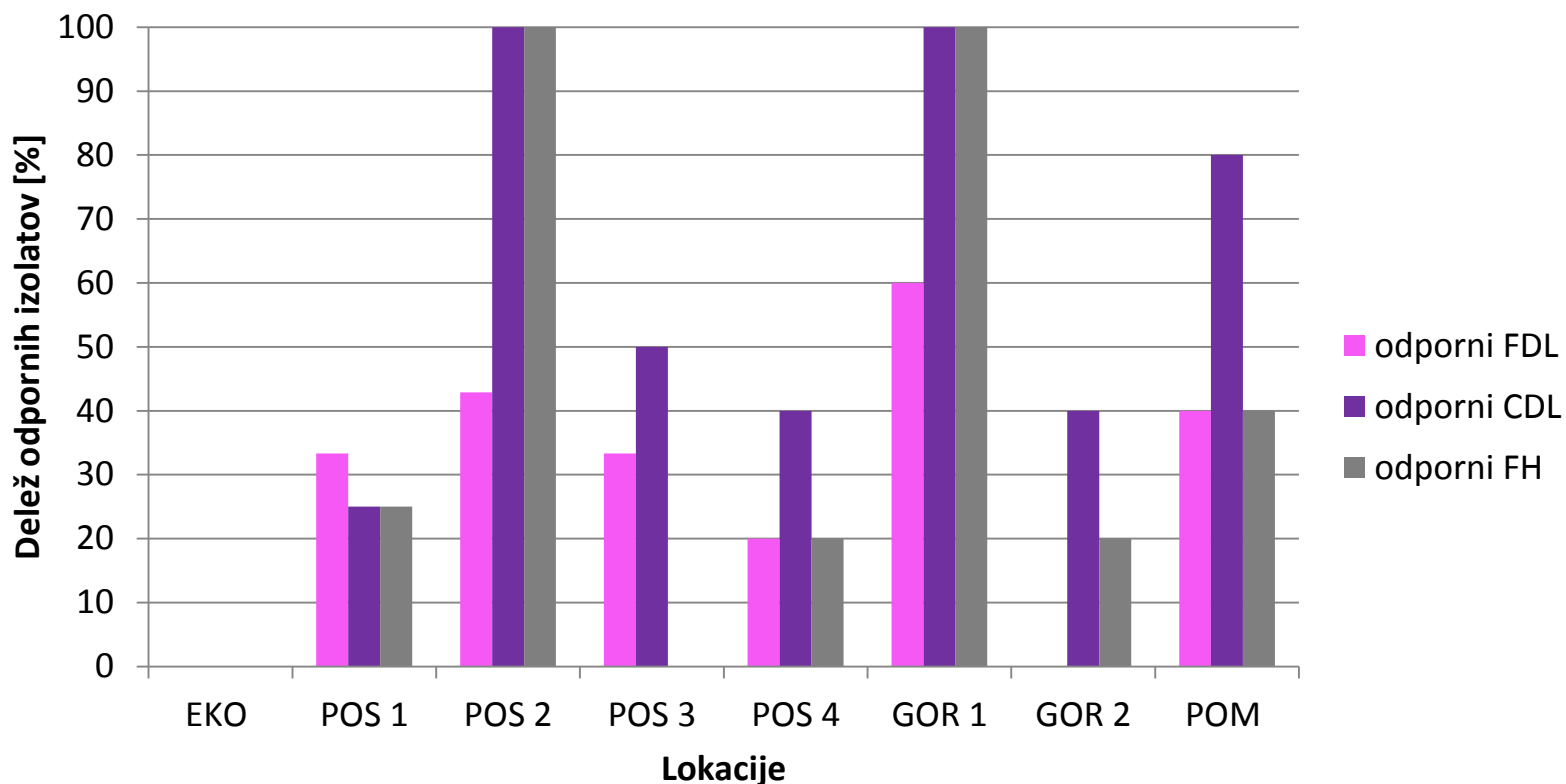
**CIPRODINIL:** 57,5 %  
izolatov **odpornih**  
10 % izolatov **manj občutljivih**

**FLUDIOKSONIL:** 28,9 %  
**odpornih**

21,1 % **manj občutljivih**

**FENHEKSAMID:** 41,5 %  
**odpornih**

# Rezultati – delež odpornih izolatov proti vsem trem a.s. glede na lokacijo



Zgolj en nasad brez odpornih izolatov (z ekološko pridelavo) , v petih nasadih zaznana odpornost proti vsem trem aktivnimi snovem (Posavje, Gorenjska, Pomurje).

# Sklepi

- Odpornost izolatov proti določeni aktivni snovi (**target site resistance**) pogosto vodi v odpornost proti drugim a.s. iz skupine z istim načinom delovanja ali/in iz iste kemijske skupine (**cross-resistance**) (Hahn, 2014).
- **57,7 %** izolatov sive plesni v slovenskih nasadih jagod odpornih proti **ciprodinilu** → sklepamo, da obstaja tudi odpornost proti pirimetanilu (ista kemijska skupina: anilino-pirimidini).
- **28,9 %** izolatov odpornih proti **fludioksonilu** in **41,5 %** proti **fenheksamidu**
- **1/3** izolatov odpornih proti **ciprodinilu, fludioksonilu in fenheksamidu**

Sklepamo, da imajo testirani izolati razvito multiplo odpornost - MDR (**multiple drug resistance**).

# Sklepi

- V nasadu jagod z ekološko pridelavo ni bilo prisotnih odpornih izolatov proti nobeni izmed testirani aktivni snovi
- Pojav odpornih MDR izolatov pri intenzivnih pridelovalcih (POS 2, GOR 1 in POM) - zatiranje sive plesni vsaj petkrat letno



GOR 1 pri 50 ppm FH - odpornost



EKO pri 0,01 ppm FH - občutljivost

# Kako lahko upočasnimo odpornost sive plesni na jagodah?

- Manj rabe fungicidov pomeni manj odpornosti in dolgoročno njihov boljši učinek
- Priporoča se predvsem škropljenje v času cvetenja, pozneje ne (zmerna raba največ 3-4x)
- Primer ustreznega škropilnega programa: v začetku cvetenja Signum, nato Switch in Teldor, možnosti registracije Luna Sensation (fluopiram + trifloksistrobin)
- Biotični pripravki Serenade, Amylo-X in Prestop za zmanjšanje potenciala
- Širjenje sive plesni lahko zmanjšujemo z:
  - ✓ Zračenjem (gostota sajenja)
  - ✓ Zmernim gnojenjem
  - ✓ Kapljičnim namakanjem
  - ✓ Higieno (odstranjevanjem okuženih plodov)

# Reference

- Brent K., Hollomon D. W. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? 2<sup>nd</sup> revised edition. FRAC, Croplife international: 56 str.
- Fernández-Ortuño D., Grabke A., Xingpeng L., Schnabel G. 2016. Independant emergence of resistance to seven chemical classes of fungicides in *Botrytis cinerea*. The American phytopathology society, *Phytopathology* 105(4): 424-432
- 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. 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
- Pokorny A., Farrar J. J. 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., 2017. 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. 2017. *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.
- 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 atnifungal 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., Hanh M. 2011. A rapid and simple method for determining fungicide resistance in *Botrytis*. *Journal of plant diseases and protection* 118 (1): 17-25