

Dobijanje laboratorijskih sojeva *Botrytis cinerea* Pers. rezistentnih na dikarboksimide *crossed-paper* metodom

Brankica Tanović

*Institut za istraživanja u poljoprivredni „Srbija”,
Centar za pesticide i zaštitu životne sredine, Zemun-Beograd*

REZIME

U radu je ispitivana pogodnost *crossed-paper* metode za dobijanje laboratorijskih sojeva *B. cinerea* rezistentnih na dikarboksimide. Praćena je pojava brzorastućih sektora micelije na podlozi sa rastućom koncentracijom iprodiona, obezbeđenom *crossed-paper* metodom i na podlozi sa homogenom koncentracijom ovog fungicida. *Crossed-paper* metodom je, za četiri do šest dana, dobijeno pet laboratorijskih sojeva *B. cinerea* visoke rezistentnosti na dikarboksimide. Na podlozi sa homogenom koncentracijom iprodiona, u istom periodu, nisu dobijeni brzorastući sektori. Faktor rezistentnosti (RF) svih laboratorijskih rezistentnih sojeva bio je veći od 2000. Četiri od pet dobijenih sojeva, zadržala su rezistentnost i posle deset presejavanja na podlogu bez fungicida.

Ključne reči: *Botrytis cinerea*; *crossed-paper* metod; dikarboksimidi; rezistentnost

UVOD

Rezistentnost fitopatogenih gljiva na fungicide je značajan problem u poljoprivredi od sedamdesetih godina prošlog veka. Proizvođači i korisnici pesticida, ili negiraju ovu pojavu - povećavajući učestalost i doze primene fungicida, ili iz pojedinačnih slučajeva rezistentnosti izvlače ishitrene zaključke i traže prestanak upotrebe pesticida. Poslednjih decenija, velika pažnja se poklanja razmatranjima različitih strategija sprečavanja rezistentnosti, često bez eksperimentalne provere teorijskih postavki. Na Konferenciji o rezistentnosti na pesticide, održanoj 1984. godine u Vašingtonu, kao prioritet u istraživanjima ovog fenomena definisano

je proučavanje mehanizama delovanja pesticida i mehanizama rezistentnosti štetnih organizama, biologije i ekologije rezistentnih populacija, kao i razvoj sistema za praćenja rezistentnosti i procenu rizika od rezistentnosti (Delp, 1994).

Imajući u vidu definisane prioritete, započeta su detaljnija proučavanja, bioloških karakteristika izolata polifagne fitopatogene gljive *Botrytis cinerea* Pers., poreklom sa različitih lokaliteta u Srbiji, i njihove osetljivosti na dikarboksimide. U prethodnom radu (Tanović, 2003) prikazani su rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *B. cinerea* iz prirodnih populacija na iprodion i vinklozolin.

Prvobitni cilj bio je da se, izolacijom patogena iz različitih domaćina gajenih na različitim lokalitetima, pronađu sojevi rezistentni na dikarboksimide i prouče njihove biološke karakteristike. Međutim, u prirodnim populacijama takvi sojevi nisu pronađeni, pa je za proučavanje osobina rezistentnih sojeva bila neophodna laboratorijska adaptacija prirodno osjetljivih sojeva na povećanu koncentraciju fungicida, odnosno laboratorijska selekcija rezistentnih sojeva *B. cinerea*.

Laboratorijski sojevi gljiva rezistentni na dikarboksimide dobijaju se gajenjem osjetljivog izolata na podlozi koja sadrži visoku koncentraciju fungicida ili uzastopnim presejavanjem izolata na podloge koje sadrže sve veću koncentraciju fungicida (Pommer i Lorenz, 1982; Beever i Brien, 1983; Leroux i Fritz, 1983; Grindle, 1984; Littley i Rahe, 1984; Pommer i Lorenz, 1995). Za dobijanje visokorezistentnog sektora micelije *B. cinerea* na hranljivoj podlozi sa subletalnom koncentracijom fungicida potrebno je nekoliko nedelja (Gouot, 1994).

U ovom radu prikazan je postupak dobijanja laboratorijskih sojeva *B. cinerea* rezistentnih na dikarboksimide adaptacijom *crossed-paper* metode, koju su De Waard i Nistelrooy (1982) uveli u primenu za testiranje toksičnosti fungicida u prisustvu drugih supstanci. Istovremeno, sojevi *B. cinerea* podvrgnuti su i laboratorijskoj selekciji metodom gajenja na podlozi koja sadrži visoku koncentraciju iprodiona. Nakon laboratorijske selekcije, testirana je osjetljivost izvornih i dobijenih sojeva na iprodion i vinklozolin i ispitivana stabilnost selekcionisane rezistentnosti.

MATERIJAL I METODE

Izolati *B. cinerea*

Za dobijanje laboratorijskih sojeva *B. cinerea*, rezistentnih na dikarboksimide, potpuno slučajno je odabran 21 izolat iz kolekcije fitopatogenih gljiva Centra za pesticide i zaštitu životne sredine (J 3, J 15, J 20, J 29, J 31, J 32, J 36, J 37, J 40, J 41, M 7, M 47, M 48, M 49, V 66, S 92, S 94, S 102, S 103, S 121, S 125). Podaci o domaćinima, lokalitetima, datumu i metodi izolacije, prikazani su u prethodnom radu Tanović (2003).

Test-supstance

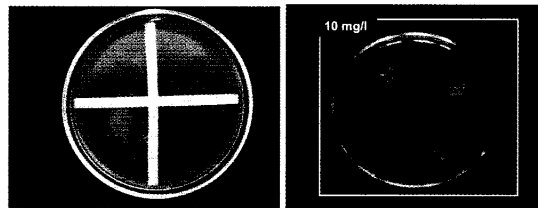
Iprodion [3-(3,5-dichlorophenyl)-N-isopropyl-2,4-dioximidazolidine-1-carboxamide], preparat Kidan EC, proizvod firme Aventis.

Vinklozolin [(RS) - 3- (3,5 - dichlorophenyl) - 5-methyl - 5-vinyl - 1,3-oxazolidine - 2,4-dione], preparat Ronilan WG, proizvod firme BASF, Nemačka.

Dobijanje laboratorijskih rezistentnih sojeva *B. cinerea*

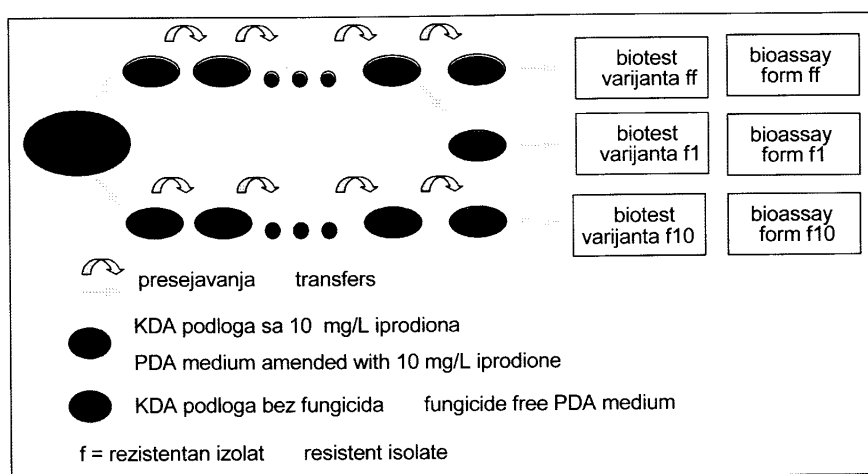
Laboratorijski rezistentni sojevi *B. cinerea* dobijeni su delimično modifikovanom *crossed-paper* metodom (De Waard i Nistelrooy, 1982; Gullino i Sisler, 1986). Osjetljivi izolati *B. cinerea* gajeni su deset dana na ravnom krompir-dekstroznom agaru (KDA) (Muntanjola-Cvetković, 1987), pri povećanoj vlažnosti i temperaturi od 20°C. Povećana vlažnost je obezbeđena razlivanjem vrele KDA podloge u Petri-kutiju pri čemu dolazi do kondenzacije na unutrašnjoj strani poklopca Petri-kutije. Pod opisanim uslovima svi izolati *B. cinerea* sporulišu.

U Petri-kuriji sa odgajenom micelijom dodavano je 10 ml sterilne destilovane vode. Micelija i konidije su sterilnom kopljastom iglom sastrugane sa KDA podloge, dobro izmešane sa vodom i izlivena u 30 mL otopljene KDA podloge, prethodno ohlađene do 50°C. Suspenzija je dobro izmešana i razlivena u tri Petri-kutije. Na očvrснуtu podlogu unakrsno su postavljene po dve trake sterilnog filter papira dimenzija 85 x 5 mm, prethodno potopljene u emulziju sa 1% iprodiona i prosušene u sterilnim uslovima. Fragmenti micelije osjetljivih izolata su istovremeno zasejani i na KDA podlogu u koju je dodato 10 mg/L iprodiona, homogeno raspoređenog u celoj zapremini podloge. KDA podloga sa rastućom i homogenom koncentracijom iprodiona, zasejana izolatom *B. cinerea* osjetljivim na dikarboksimide, prikazana je na Slici 1.



Slika 1. KDA podloga sa rastućom (levo) i homogenom koncentracijom iprodiona (desno), zasejana izolatom *B. cinerea* osjetljivim na dikarboksimide

Figure 1. PDA medium containing an increasing (left) and homogeneous iprodione concentration (right), inoculated with an isolate of *B. cinerea* sensitive to dicarboximides



Slika 2.
Šema ispitivanja promene osetljivosti izolata *B. cinerea* u odsustvu fungicida

Figure 2.
Scheme of sensitivity change testing in the absence of fungicide in *B. cinerea* isolates

Pojava brzorastućih sektora micelije praćena je na podlozi sa rastućom koncentracijom iprodiona (u sterilnim zonama oko traka filter papira) i na podlozi sa homogenom koncentracijom ovog fungicida. Izolati dobijeni od ovih sektora su, uz raniji naziv izolata, dobili oznaku „f” i dalje su čuvani na KDA podlozi sa 10 mg/L iprodiona (Farettra i Pollastro, 1991). Dobijeni rezistentni (f) izolati su sa podloge na kojoj su čuvani presejavani na KDA podlogu bez fungicida i, nakon inkubacije od četiri dana, korišćeni za sve biotestove, osim u slučajevima kada je drugačije naglašeno.

Procena parametara osetljivosti dobijenih izolata na iprodion i vinklozolin

Parametri osetljivosti izolata na iprodion i vinklozolin procenjeni su po delimično modifikovanoj metodi Leroux i Gredt (1972). Posmatrano je delovanje fungicida na porast micelije izolata *in vitro*. Fungicidi su dispergovani u sterilnoj destilovanoj vodi a zatim, uz neprestano mešanje na magnetnoj mešalici, aseptično dodavani u rastoplenu KDA podlogu prethodno ohlađenu do 50°C. Odnos mešanja fungicida i podloge bio je 1:9. U KDA podlogu u kontroli dodavana je sterilna destilovana voda, tako da je efekat rastvarača i ostalih sastojaka u formulacijama pesticida zanemaran. Preliminarnim ispitivanjem su pronađene koncentracije fungicida u podlozi kojima se postiže inhibicija porasta izolata između 5% i 95% u odnosu na kontrolu. Za procenu parametara osetljivosti korišćena je skala simetrično raspoređenih koncentracija u utvrđenom opsegu, kako bi se dobila što pouzdanija vrednost parametra EC-50 (Robertson i sar., 1984).

Na središnji deo pripremljene podloge, razlivena u Petri-kutije ($R = 90$ mm), postavljani su kružni iseći micelije ispitivanih izolata ($R = 10$ mm) i inkubirani na temperaturi od 20°C. Svi testovi su izvedeni u tri ponavljanja. Nakon inkubacije od tri dana za osetljive i četiri dana za rezistentne izolate, mereno je šest radijalno raspoređenih rastojanja od ivice kolonije do ivice inokuluma. Za probit analizu uzimani su odgovori na najmanje četiri koncentracije, preračunati na procenat inhibicije u odnosu na kontrolu. Procenjene su koncentracije koje inhibiraju porast micelije 50%, odnosno 90% u odnosu na kontrolu (vrednosti EC-50 i EC-90 i nagib regresione linije (b). Kriterijum za značajno razlikovanje dve regresione linije bilo je nepreklapanje intervala poverenja za EC-50 i EC-90 vrednosti na nivou verovatnoće 0.05.

Faktori rezistentnosti (RF) su izračunati kao odnos EC-50 posmatranog i EC-50 najosetljivijeg izolata (Dekker, 1995). Nivo rezistentnosti je ocenjen na osnovu skale koju je predložio Gouot (1994):

- RF < 3 - osetljivi izolati;
- RF = 3 - 20 - umereno rezistentni;
- RF > 100 - visokorezistentni izolati.

Promena osetljivosti rezistentnih izolata u odsustvu fungicida

Za proučavanje promene osetljivosti rezistentnih izolata u odsustvu fungicida micelija rezistentnih izolata je prvo presejana na KDA podlogu koja sadrži 10 mg/L iprodiona i KDA podlogu bez fungicida. Izolati su dalje presejavani u intervalima od sedam dana po šemi prikazanoj na Slici 2.

Za biotest je korišćena micelija izolata starosti četiri dana gajena na KDA podlozi koja sadrži 10 mg/L iprodiona (varijanta ff), jednom presejana (varijanta f1) i deset puta presejavana (varijanta f10) na KDA podlogu bez fungicida.

Parametri osetljivosti na iprodion, za sve tri varijante f - izolata, procenjeni su na način opisan u prethodnom potpoglavlju. Kriterijum za statistički značajno razlikovanje EC-50 i EC-90 vrednosti je nepreklapanje intervala poverenja ($p = 0.05$).

U drugom, kvalitativnom ogledu, sve tri varijante f - izolata su istovremeno zasejavane na KDA podlogu koja sadrži 10 mg/L iprodiona i na KDA podlogu bez fungicida. Praćen je početak rasta f - izolata na podlozi u koju je dodat fungicid, a prečnik porasta micelije meren je nakon inkubacije od tri dana. Ogled je izveden u četiri ponavljanja. Značajnost razlika porasta izolata na podlozi sa dodatim iprodionom i u kontroli testirana je t - testom.

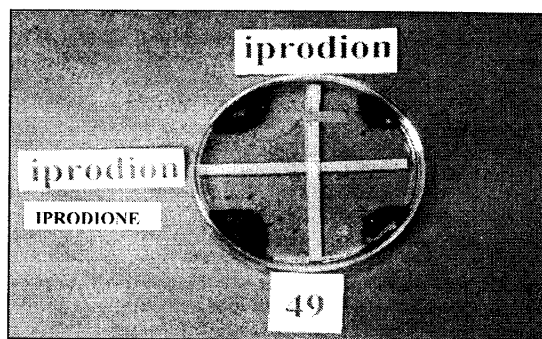
Za izolate koji su posle deset presejavanja ostali rezistentni na iprodion procenjeni su parametri osetljivosti (EC-50 i EC-90) na vinklozolin i prikazani sa intervalima poverenja na nivou $p = 0.05$.

REZULTATI

Na podlozi sa rastućom koncentracijom iprodiona dobijeno je ukupno pet visokorezistentnih sektora micelije *B. cinerea*. U istom periodu, na podlozi sa homogenom koncentracijom fungicida nije bilo brzorastućih sektora (Slika 3, Tabela 1).

Tabela 1. Poreklo rezistentnih sojeva *B. cinerea*
Table 1. Origine of resistant strains of *B. cinerea*

Domaćin Host	Izolat iz prirodne populacije Isolate from natural population	Odgovarajući rezistentan izolat Corresponding resistant strain
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



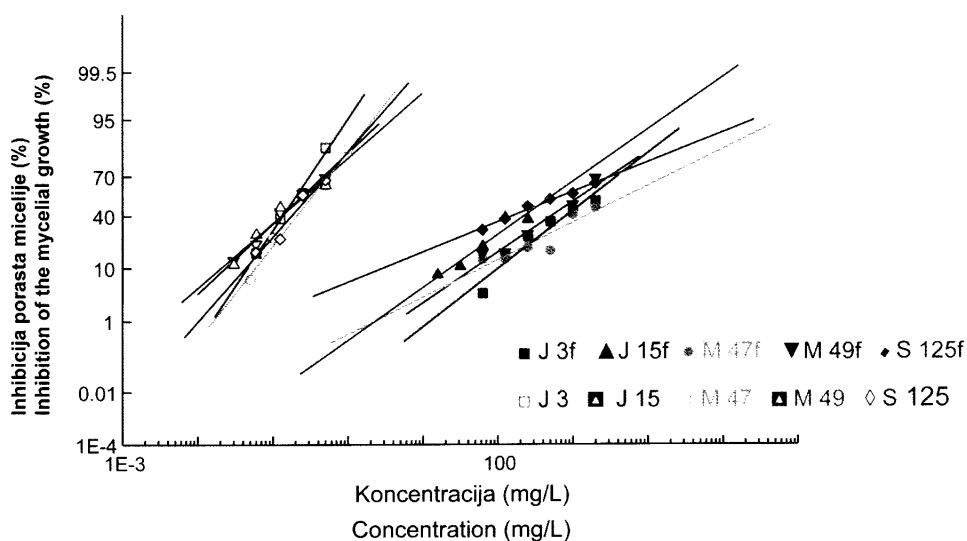
Slika 3. Rezistentni sektor izolata *B. cinerea* (M 49) u neposrednoj blizini trake impregnirane iprodionom

Figure 3. The resistant sector of *B. cinerea* isolate (M 49) in close proximity of the strip impregnated with iprodione

Parametri osetljivosti izolata na iprodion

Na Slici 4 prikazane su ec-p linije toksičnosti iprodiona za izolate *B. cinerea*. Od izolata iz prirodnih populacija najmanju osetljivost ispoljio je izolat M 47 poreklom iz maline (EC-50 = 0.28 mg/L; EC-90 = 1.44 mg/L; $b = 1.81$; RF = 1.55), a najosetljiviji je bio izolat J 3 iz jagode (EC-50 = 0.18 mg/L; EC-90 = 0.68 mg/L; $b = 2.17$; RF = 1). Intervali poverenja za EC-50 i EC-90 vrednosti (CI 95%) bili su potpuno razdvojeni tako da je razlika u osetljivosti ovih izolata na iprodion statistički značajna. Vrednosti parametara osetljivosti za preostala tri izolata su, logično, između navedenih graničnih vrednosti, s tim što se intervali poverenja i za EC-50 i EC-90 preklapaju sa vrednostima dobijenim za izolate M 47 i/ili J 3.

Na osnovu izračunatog faktora rezistentnosti (RF < 3) i kriterijuma po Gouot-u (1994), svi izolati iz prirodnih populacija su osetljivi na iprodion. Od laboratorijski dobijenih izolata najmanju osetljivost na iprodion imao je izolat M 47f (EC-50 = 3118.8 mg/L; EC-90 = 147340 mg/L; $b = 0.77$; RF = 17326.7). Najosetljiviji je bio izolat M 49f (EC-50 = 389.8 mg/L; EC-90 = 6890.8 mg/L; $b = 1.03$; RF = 2165.6). Intervali poverenja za EC-50 vrednosti se ne preklapaju, dok je za EC-90 preklapanje delimično. Faktor rezistentnosti (RF) za sve laboratorijski dobijene sojeve bio je veći od 100, pa se na osnovu kriterijuma Gouot-a (1994), može konstatovati da su svi visokorezistentni na iprodion.



J = jagoda, M = malina, S = salata, f = laboratorijski dobijeni izolati
J = strawberry, M = raspberry, S = lettuce, f = strain obtained in the laboratory

Slika 4. Regresione linije toksičnosti iprodiona za laboratorijske izolate *B. cinerea* rezistentne na dikarboksimide i izolate od kojih su dobijeni

Figure 4. Regression lines of the toxicity of iprodione to the laboratory resistant isolates of *B. cinerea* and the isolates from which they were obtained

Parametri osjetljivosti izolata na vinklozolin

U tabeli 2 prikazani su parametri toksičnosti vinklozolina za izolate *B. cinerea*. Od izolata iz prirodnih populacija najosjetljiviji na vinklozolin bio je izolat M 49 iz maline sa EC-50 vrednošću od 0.13 mg/L, a najmanje osjetljiv izolat M 47 takođe iz maline (LC-50 = 0.20 mg/L; RF = 1.5). Intervali poverenja za obe EC vrednosti (EC-50 i EC-90) u potpunosti se preklapaju tako da nema statistički značajne razlike u osjetljivosti na vinklozolin.

Na osnovu izračunatog faktora rezistentnosti (RF < 3) i kriterijuma po Gouot-u (1994), svi izolati iz prirodnih populacija su osjetljivi na vinklozolin. Od laboratorijski dobijenih rezistentnih izolata najosjetljiviji je bio izolat J 15f (EC-50 = 844.8 mg/L; RF = 6498.5), a najmanje osjetljiv S 125f (EC-50 = 3279.6 mg/L; RF = 25227.7). Za izolat M 47f nije dobijena regresiona linija. Na podlozi koja sadrži 1000 mg/L vinklozolina ovaj izolat raste brže nego u kontroli. Nakon inkubacije od četiri dana, prosečan prečnik porasta micelije izolata M 47f na KDA podlozi u koju je dodato 1000 mg/L vinklozolina iznosio je 27.3 mm, a u

kontroli 16.2 mm. Nemoguće je ovakav odgovor transformisati u binarni, odnosno izračunati procenat inhibicije u odnosu na kontrolu.

Promena osjetljivosti na iprodin

U Tabeli 3 prikazani su parametri toksičnosti iprodiona za uzastopno presejavane selekcionisane sojeve *B. cinerea*. Posle deset presejavanja na podlogu bez fungicida rezistentni izolat J 15f je postao osjetljiv na iprodion. EC-50 vrednost za iprodion se smanjila sa 954 mg/L (RF = 5305.0) na 0.24 mg/L (RF = 1.3) a intervali poverenja za EC-50 i EC-90 vrednosti su se potpuno razdvojili. Ostali proučavani izolati su i posle deset presejavanja bili rezistentni na iprodion.

Zabeležena je razlika između faktora rezistentnosti izolata M 49f posle jednog (RF = 2168.5) i posle deset (RF = 169.4) presejavanja na podlogu bez fungicida. Međutim, razlika u osjetljivosti ove dve varijante izolata M 49f nije statistički značajna, zbog potpunog preklapanja intervala poverenja za EC-90 vrednost. Za ff varijantu izolata M 47f nismo dobili regresionu liniju zbog konstantne heterogenosti podataka dobijenih u eksperimentu.

Tabela 2. Parametri toksičnosti vinklozolina za izolate *B. cinerea***Table 2.** Toxicity parameters of vinclozolin to the isolates of *B. cinerea*

Izolat Isolate	EC-50 (mg/L) (CI 95%)	EC-90 (mg/L) (CI 95%)	b (CI 95%)	H	RF
J 3	0.19 bc (0.17-0.21)	0.53 a (0.44-0.68)	2.81 (2.58-3.04)	1.49	1.46
J 15	0.15 a (0.13-0.16)	0.41 a (0.35-0.51)	2.84 (2.60-3.08)	0.60	1.15
M 47	0.20 abc (0.11-0.42)	0.62 a (0.61-5.72)	2.60 (2.44-2.83)	3.21	1.54
M 49	0.13a (0.11-0.15)	0.51a (0.40-0.70)	2.14 (1.92-2.36)	0.11	1.0
S 125	0.18 abc (0.16-0.20)	0.57 a (0.46-0.76)	2.54 (2.31-2.77)	0.61	1.38
J 3f	2122.7 de (1330.2-4691.7)	17546.2 b (7081.7-90149.7)	1.40 (1.19-1.61)	1.38	16328.5
J 15f	844.8 e (539.7-1367.4)	62383.4 b (24161.6-267870)	0.69 (0.61-0.77)	1.62	6498.6
M 47f [#]	>1500	-	-	-	-
M 49f	1642.7 de (1229.1-2441.0)	19624.3 b (10112.0-53226.8)	1.19 (1.06-1.32)	1.98	12636.2
S 125f	3279.6 d (1828.7-10046.4)	36244.8 b (11365.6-36559.0)	1.23 (1.02-1.44)	1.30	25227.7

J = jagoda; M = malina; S = salata; f = laboratorijski dobijeni izolati; EC-50 i EC-90 vrednosti označene različitim slovima razlikuju se na osnovu nepreklapanja intervala poverenja na nivou verovatnoće 0.05.

CI = interval poverenja; b = koeficijent regresije; H = heterogenost; RF = faktor rezistentnosti; [#]EC - vrednosti nisu procenjene - izolat na KDA podlozi sa 1000 mg/L vinklozolina raste brže nego u kontroli (KDA + sterilna destilovana voda).

J = strawberry; M = raspberry; S = lattuce; f = strain obtained in the laboratory, EC-50 and EC-90 values for the various forms of a single f isolate designated by different letters differ on the basis of non-overlapping intervals ($p = 0.05$). CI = confidence interval; b = regression coefficient; H = heterogeneity; RF = resistance factor. [#]EC - values were not estimated - the growth of the isolate on PDA medium containing 1000 mg/L was faster then on the control medium (PDA + sterile destiled water).

Tabela 3. Promena parametara osetljivosti f izolata *B. cinerea* na iprodion u odsustvu fungicida
 Table 3. Change in iprodione toxicity parameters in f isolates of *B. cinerea* in the absence of the fungicide

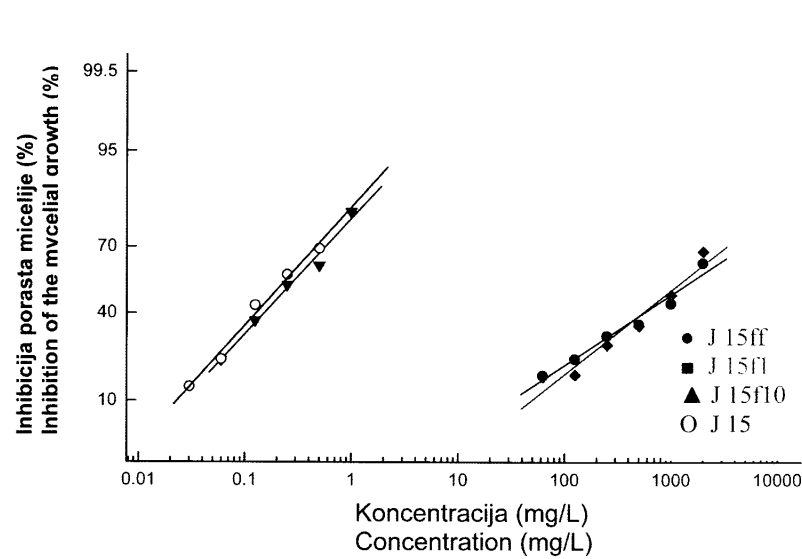
Varijanta f-izolata Type of f-isolate	EC-50 (mg/L) (CI 95%)	EC-90 (mg/L) (CI 95%)	b (CI 95%)	H	FR
J 3ff	1186.4 a (890.2-2241.2)	20397.7 a (9932.0-61408.2)	1.04 (0.92-1.96)	0.65	6591.1
J 3f1	1455.2 a (1068.7-2241.2)	25367.70 a (11793.0-83243.8)	1.03 (0.91-1.15)	1.21	8084.4
J 3f10	1615.3 a (1095.0-3097.6)	54111.4 a (16771.4-538700)	0.84 (0.70-0.98)	0.74	8973.9
J 15ff	1101.9 b (785.4-1777.1)	38056.8 b (14544.8-188510)	0.83 (0.72-0.94)	0.57	6121.7
J 15f1	954.9 b (725.2-1361.5)	17932.52 b (8821.8-53171.5)	1.00 (0.89-1.11)	1.12	5305
J 15f10	0.24 c (0.19-0.29)	2.14 c (1.41-3.99)	2.14 (2.00-2.28)	0.56	1.3
M 47ff [§]	> 1500	-	-	-	-
M 47f1	3118.8 d (1825.1-7740.6)	147340 d (37907.8-1748800)	0.77 (0.65-0.89)	1.98	17326.7
M 47f10	1576.7 d (1074.5-2801.0)	53498.8 d (18989.1-306490)	0.84 (0.73-0.95)	0.87	8759.4
M 49ff	288.5 e (205.2-488.9)	3309.3 e (1487.6-12782.1)	1.21 (1.05-1.37)	0.71	1602.8
M 49 f1	389.8 e (249.3-841.2)	6890.8 e (2368.2-49688.0)	1.03 (0.87-1.19)	1.55	2165.5
M 49f10	30.5 f (16.38-49.29)	12636.6 e (2332.3-65042.0)	0.49 (0.39-0.59)	0.30	169.4
S 125ff	1288.3 g (946.4-1961.4)	25485.4 g (11611.0-86850.9)	0.99 (0.87-1.11)	0.21	7157.2
S 125f1	441.4 h (293.9-700.3)	67783 g (17017.2-1089600)	0.59 (0.49-0.69)	0.13	2452.2
S 125f10	654.1 gh (416.0-1257.9)	186320 g (31701.2-943460)	0.52 (0.42-0.62)	0.25	3633.9

J = jagoda; M = malina; S = salata; [§]EC-vrednosti nisu procenjene zbog konstantno visoke heterogenosti podataka; ff = za biotest korišćeni fragmenti micelije rezistentnog izolata sa podloge koja sadrži 10 mg/L iprodiona; f1 = rezistentni izolat je pre biotesta jednom presejan sa podloge za čuvanje na KDA podlogu bez fungicida; f 10 = biotest posle deset uzastopnih presejanja rezistentnog izolata na KDA podlogu bez fungicida; EC-50 i EC-90 vrednosti za različite varijante jednog f-izolata označene različitim slovima razlikuju se na osnovu nepreklopanja intervala poverenja (p = 0.05).

CI = interval poverenja; b = koeficijent regresije; H = heterogenost; RF = faktor rezistentnosti.

J = strawberry; M = raspberry; S = lettuce; [§]EC-values were not estimated because of continuously high heterogeneity of the data; ff = bioassay was performed using mycelial fragment of the culture of resistant isolate grown on medium containing 10 mg/L iprodione; f1 = prior to conducting the bioassay, the resistant isolate was transferred from the stock medium to fungicide free PDA medium; f10 = bioassay was conducted after 10 subsequent transfers of the resistant isolate to the fungicide free PDA medium; EC-50 and EC-90 values for the various forms of a single f-isolate designated by different letters differ on the basis of non-overlapping intervals (p = 0.05).

CI = confidence interval; b = regression coefficient; H = heterogeneity; RF = resistance factor.

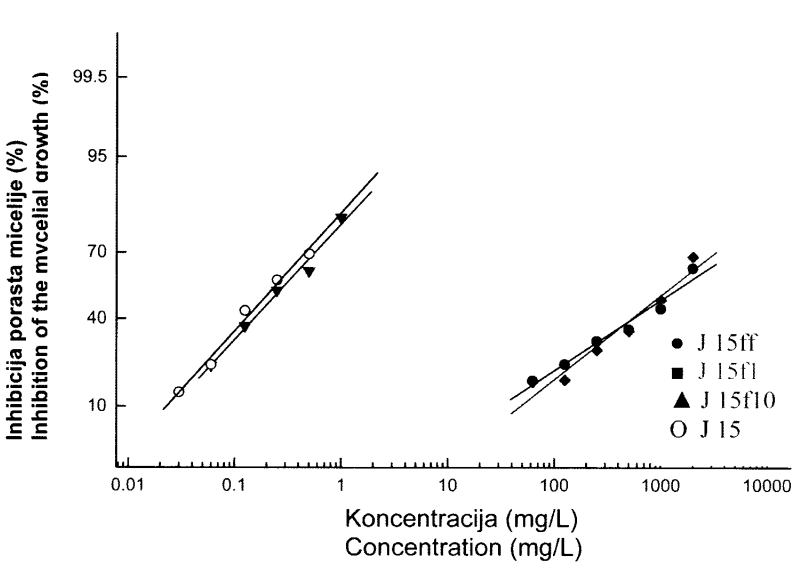


ff = za biotest korišćeni fragmenti micelije sa podloge koja sadrži 10 mg/L iprodiona; f1 = rezistentni izolat je pre biotesta jednom presejan sa podloge za čuvanje na KDA podlogu bez fungicida; f10 = biotest posle deset uzastopnih presejanja rezistentnog izolata na KDA podlogu bez fungicida; J = jagoda, f = laboratorijski dobijen izolat

ff = bioassay was performed using mycelial fragment of the culture of resistant isolate grown on medium containing 10 mg/L iprodione; f1 = prior to conducting the bioassay, the resistant isolate was transferred from the stock medium to fungicide free PDA medium; f10 = bioassay was conducted after 10 subsequent transfers of the resistant isolate to the fungicide free PDA medium J = strawberry; f = strain obtained in the laboratory

Slika 5. Regresione linije promene osetljivosti na iprodion izolata J 15f u odsustvu fungicida u podlozi i linija normalno osetljivog izolata J 15

Figure 5. Regression lines representing change in iprodione toxicity to the J 15f isolate in the absence of the fungicide and sensitivity of the original isolate J 15



ff = za biotest korišćeni fragmenti micelije sa podloge koja sadrži 10 mg/L iprodiona; f1 = rezistentni izolat je pre biotesta jednom presejan sa podloge za čuvanje na KDA podlogu bez fungicida; f10 = biotest posle deset uzastopnih presejanja rezistentnog izolata na KDA podlogu bez fungicida; J = jagoda, f = laboratorijski dobijen izolat

ff = bioassay was performed using mycelial fragment of the culture of resistant isolate grown on medium containing 10 mg/L iprodione; f1 = prior to conducting the bioassay, the resistant isolate was transferred from the stock medium to fungicide free PDA medium; f10 = bioassay was conducted after 10 subsequent transfers of the resistant isolate to the fungicide free PDA medium J = strawberry; f = strain obtained in the laboratory

Slika 6. Regresione linije promene osetljivosti na iprodion izolata J 3f u odsustvu fungicida u podlozi i linija normalno osetljivog izolata J 3

Figure 6. Regression lines representing change in iprodione toxicity to the J 3f isolate in the absence of the fungicide and sensitivity of the original isolate J 3

Na Slikama 5 i 6 su, kao ilustracija promene osetljivosti, prikazane regresione linije osetljivosti na iprodion različitih varijanti izolata J 15f i J 3f, kao i regresione linije osetljivosti izvornih izolata iz prirodnih populacija (J 3 i J 15).

U Tabeli 4 prikazan je porast selekcionisanih sojeva *B. cinerea* na podlozi koja sadrži 10 mg/L iprodiona i na podlozi bez fungicida. Kvalitativnim testom je potvrđeno da svi rezistentni izolati, osim J 15f, zadržavaju rezistentnost na iprodion posle 10

presejavanja na podlogu bez fungicida, kao i da izolat J 15f prestaje da raste na podlozi sa 10 mg/L iprodiona posle petog presejavanja na podlogu bez fungicida.

Promena osetljivosti na vinklozolin

U Tabeli 5 prikazani su parametri toksičnosti vinklozolina za uzastopno presejavane selekcionisane sojeve *B. cinerea* koji su posle deset uzastopnih presejavanja na podlogu bez fungicida, ostali rezistentni na iprodion.

Tabela 4. Promena osetljivosti visokorezistentnih izolata *B. cinerea* na iprodion u odsustvu fungicida

Table 4. Change in iprodione toxicity to highly resistant isolates of *B. cinerea* in the absence of the fungicide

Izolat Isolate	Varijanta f-izolata Type of f-isolate	Prosečan prečnik micelije Diameter of the mycelial growth (mm)		t [#]
		Iprodion Iprodione (10 mg/L)	Kontrola Control	
J 3f	ff	14.2	14.3	0.50
	f1	13.9	14.7	1.01
	f10	11.9	11.2	1.85
J 15f	ff	13.1	13.6	0.76
	f1	4.1	21.4	24.93*
	f5	6.5	18.5	11.11*
	f6	0	17.2	41.36*
M 49f	ff	13.7	16.2	3.97*
	f1	10.5	19.9	12.43*
	f10	8.4	16.1	6.80*
S 125f	ff	9.9	11.6	2.35*
	f1	6.2	16.4	10.09*
	f10	3.1	8.6	8.62*
M 47f	ff	13.1	10.8	2.76*
	f1	15.5	10.6	5.86*
	f10	6.0	5.4	0.53

J = jagoda; M = malina; S = salata; f = laboratorijski dobijen rezistentni izolat.

*Standardizovna razlika aritmetičkih sredina; *Statistički značajno na nivou $p = 0.05$. ff = za biotest korišćeni fragmenti micelije rezistentnog izolata sa podloge koja sadrži 10 mg/L iprodiona; f1 = rezistentni izolat je pre biotesta jednom presejan sa podloge za čuvanje na KDA podlogu bez fungicida; f5 = biotest posle pet uzastopnih presejavanja na KDA podlogu bez fungicida; f6 = biotest posle šest uzastopnih presejavanja na KDA podlogu bez fungicida; f10 = biotest posle deset uzastopnih presejanja rezistentnog izolata na KDA podlogu bez fungicida.

J = strawberry; M = raspberry; S = lettuce; f = strain obtained in the laboratory; *Standardized difference of arithmetical means; *Significantly different at $p = 0.05$; ff = bioassay was performed using mycelial fragment of the culture of resistant isolate grown on medium containing 10 mg/L iprodione; f1 = prior to conducting the bioassay, the resistant isolate was transferred from the stock medium to fungicide free PDA medium; f5 = bioassay was conducted after 5 subsequent transfers of the resistant isolate to the fungicide free PDA medium; f6 = bioassay was conducted after 6 subsequent transfers of the resistant isolate to the fungicide free PDA medium; f10 = bioassay was conducted after 10 subsequent transfers of the resistant isolate to the fungicide free PDA medium.

DISKUSIJA

Prouzrokovatelj sive truleži, *B. cinerea*, visoko je varijabilna vrsta (Grindle, 1979; Di Lena i sar., 1981; Leone, 1990; Movahedi i Heale, 1990). Varijabilnost u okviru vrste posledica je višejedarnosti micelije koja je u prirodnim populacijama najčešće heterokarionska. Na heterokarionskoj miceliji nastaju heterokarionske konidije, sa prosečno četiri do šest jedara po ćeliji, čime se potencijal za varijabilnost povećava (Hansen i Smith, 1932; Shirane i sar., 1988). Kasnija proučavanja Grindle-a (1979) i Lorezn-a (1983) potvrdila su mišljenje Hansen-a i Smith-a (1932), dok su Akutsu i saradnici (1987. i 1988) pokazali da je anastomoza hifa veoma značajna za varijabilnost vrste zbog „prelaska” jedara iz jednog talusa *B. cinerea* u drugi. Faretra i Pollastro (1993) smatraju da heterokarionske vrste mogu da sadrže jedra sa alelima osetljivosti i jedra sa alelima rezistentnosti na dikarboksimide u istoj ćeliji, a na promene uslova sredine odgovaraju prilagođavanjem proporcije ove dve vrste jedara, odnosno prisustvo fungicida u podlozi izaziva povećanje učestalosti jedara sa alelima rezistentnosti.

Pošto je formiranje anastomoza između hifa *B. cinerea* česta pojava, prelazak jedara iz jednog talusa u drugi eksperimentalno dokazan, a promena proporcije jedara u ćeliji odgovor na promenu uslova sredine, pored već opisanih načina za dobijanje rezistentnih sojeva (Pommer i Lorenz, 1982; Leroux i Fritz, 1983; Pommer i Lorenz, 1995), pokušano je da se promenom načina izlaganja izolata fungicidu dobiju laboratorijski rezistentni sojevi. Od 21 izolata *B. cinerea*, slučajno izabranog iz prikupljene kolekcije, dobijeno je pet laboratorijskih sojeva visoke rezistentnosti na iprodion, ali samo na podlozi sa rastućom koncentracijom fungicida. Ovi sojevi mogu da rastu na podlozi koja sadrži 1000 mg/L iprodiona, što je u skladu sa rezultatima Leroux-a i saradnika (1977, *loc. cit.* Pommer i Lorenz, 1995) koji su prvi saopštili da je u laboratorijskim uslovima moguće dobiti sojeve *B. cinerea* visoke rezistentnosti na dikarboksimide. Ovi autori su dobili visokorezistentne laboratorijske izolate sa vrednostima parametra EC-50 većim od 100 i 500 mg/L. Kasnija istraživanja Lorenz-a i Pomer-a (1985, *loc. cit.* Pommer i Lorenz, 1995) i Yourman-a i saradnika (2000) potvrđuju ove rezultate. Tako, Pommer i Lorenz (1995) navode da su promene osetljivosti izolata *B. cinerea* na dikarboksimide u prisustvu fungicida posledica homokariotizacije. Oni su od

stabilnih laboratorijskih izolata *B. cinerea* normalne osetljivosti na dikarboksimide dobili rezistentne laboratorijske sojeve sa EC-50 vrednošću većom od 500 mg/L, ali pokušaj adaptacije izolata *B. cinerea* iz prirodnih populacija na povećanu koncentraciju dikarboksimida bio je neuspešan.

Prema našim rezultatima, od izolata *B. cinerea* iz prirodnih populacija se, za četiri do šest dana, mogu dobiti rezistentni sojevi ako se koristi hranljiva podloga sa rastućom koncentracijom iprodiona (Slika 3, Tabela 1). Gajenjem izolata na podlozi sa homogenom koncentracijom fungicida u ovom periodu nismo dobili rezistentne sektore, što je u skladu sa rezultatima Gouot-a (1994). Prema ovom autoru, za dobijanje visokorezistentnog sektora *B. cinerea* na hranljivoj podlozi sa subletalnom koncentracijom fungicida, potrebno je nekoliko nedelja. Naši rezultati su pokazali da se promenjenim načinom izlaganja izolata fungicidu brže dobijaju laboratorijski sojevi *B. cinerea* rezistentni na dikarboksimide.

Na osnovu procenjenih parametara osetljivosti, kao i na osnovu izračunatog faktora rezistentnosti, svi odabrani izolati iz prirodnih populacija su osetljivi na iprodion (Slika 4). Slične vrednosti parametra EC-50 za iprodion za izolate *B. cinerea* iz prirodnih populacija su objavili Hayashi i saradnici (2001). Raspon EC-50 vrednosti je bio od 0.05 do 0.127 mg/L iprodiona. Nešto veće vrednosti ovog parametra (0.594 mg/L) navode Steel i Nair (1993). LaMondia i Douglas (1997) su prikazali samo broj izolata čija je EC-50 vrednost manja od 1 mg/L. Autori ovu koncentraciju smatraju granicom za osetljivost na iprodion.

Faktor rezistentnosti (RF) za sve laboratorijski dobijene sojeve *B. cinerea* bio je veći od 100, te su, na osnovu kriterijuma Gouot-a (1994), svi visokorezistentni na iprodion. Međutim, zabeležena je statistički značajna razlika u osetljivosti ovih izolata na iprodion. Intervali poverenja za EC-50 vrednosti za najmanje osetljiv (M 47f) i najosetljiviji izolat (M 49f) bili su potpuno razdvojeni, dok je preklapanje intervala poverenja za EC-90 vrednosti bilo delimično (Slika 4). Pošto je primenjen simetričan raspored koncentracija radi procene EC-50 vrednosti (Robertson i Preisler, 1992), neznatno preklapanje širokih intervala poverenja za EC-90 vrednosti suštinski ne ugrožava ocenu o statistički značajnoj razlici u osetljivosti ovih izolata.

Parametri osetljivosti izolata na vinklozolin

Među proučavanim izolatima *B. cinerea* iz prirodnih populacija nije zabeležena značajna razlika u osetljivosti na vinklozolin jer su se intervali poverenja za obe EC vrednosti za najosetljiviji i najmanje osetljiv izolat (EC-50 i EC-90) potpuno preklapili (Tabela 5). Na osnovu izračunatog faktora rezistentnosti ($RF < 3$ za sve izolate) i kriterijuma po Gouot-u (1994), svi izolati iz prirodnih populacija pripadaju kategoriji osetljivih na vinklozolin. Faretra i Polastro (1991. i 1993), međutim, razvrstavaju izolate u kategorije osetljivosti na osnovu EC-50 vrednosti. Po njima su na vinklozolin osetljivi svi izolati sa EC-50 vrednošću manjom od 1 mg/L. Stehmann i De Waard (1996) i LaMondia i Douglas (1997) koriste isti kriterijum, s tim što oni ne navode dobijene vrednosti parametara EC-50, već samo konstatuju da su one niže od 1 mg/L za osetljive izolate. Prema Choi-u i saradnicima (1997) izolati čija je EC-50 vrednost oko 0.5 mg/L su osetljivi na vinklozolin. Naši izolati, i na osnovu ovih kriterijuma, pripadaju kategoriji osetljivih na vinklozolin.

Promena osetljivosti izolata na iprodion

Posle deset uzastopnih presejavanja na podlogu bez fungicida rezistentni izolat J 15f postao je osetljiv na iprodion. Ostali proučavani rezistentni izolati su i posle deset presejavanja ostali rezistentni. Zabeleženo je smanjenje faktora rezistentnosti izolata M 49f posle jednog i posle deset presejavanja. Međutim, razlika u osetljivosti ove dve varijante izolata M 49f nije statistički značajna zbog potpunog preklapanja intervala poverenja EC-90 vrednost (Tabela 3). Kvalitativnim testom je potvrđeno da svi rezistentni izolati, osim J 15f, zadržavaju rezistentnost na iprodion posle deset presejavanja na podlogu bez fungicida.

Upoređivanjem parametara osetljivosti *f*-izolata na iprodion (Tabela 3) i rezultata kvalitativnog ispitivanja osetljivosti (Tabela 4), zaključujemo da je kriterijum za rezistentnost koji smo koristili u kvalitativnom testu za masovno testiranje izolata iz prirodnih populacija u prethodnom radu (Tanović,

2003) odgovarajući. U originalnoj metodi Locher i Lorenz (1991) definisana je samo diskriminativna koncentracija fungicida (10 mg/L), ali ne i vreme i način očitavanja rezultata. Prema našim rezultatima, na iprodion su rezistentni svi izolati koji počinju da rastu na podlozi sa diskriminativnom koncentracijom fungicida istovremeno sa kontrolom - KDA podloga bez fungicida (drugi dan od zasejavanja), bez obzira da li je porast izolata delimično inhibiran ili ne. Naime, postoji statistički značajna razlika u porastu svih varijanti izolata M 49f i S 125f na podlozi sa fungicidom i u kontroli, dok su, na osnovu EC vrednosti, ovi izolati visokorezistentni na iprodion. Znači, porast visokorezistentnih izolata može biti delimično inhibiran na podlozi sa diskriminativnom koncentracijom iprodiona (Tabela 4).

Promena osetljivosti izolata na vinklozolin

Svi izolati *B. cinerea* koji su ostali rezistentni na iprodion posle deset presejavanja na podlogu bez fungicida (Tabela 3), rezistentni su i na vinklozolin (Tabela 5). Yourman i saradnici (2001) su ispitivali promenu osetljivosti izolata *B. cinerea* na vinklozolin i tiofanat-metil tokom dvadeset presejavanja na podlogu bez fungicida. Kriterijum za razdvajanje osetljivih i rezistentnih fenotipova je bilo normalno klijanje konidija izolata na podlozi koja sadrži 5 mg/L vinklozolina. Autori su zaključili da se presejavanjem izolata na podlogu bez fungicida mogu dobiti i rezistentni i osetljivi fenotipovi, bez obzira da li je početni izolat rezistentan ili osetljiv na ovaj fungicid. Statistička značajnost promena osetljivosti u ovom radu, međutim, nije naznačena.

Utvdili smo da je *crossed-paper* metoda pogodna za selekciju sojeva *B. cinerea* rezistentnih na dikarboksimide, jer se, u poređenju sa standardnim postupkom, brže dobijaju laboratorijski rezistentni sojevi. Ovakvi sojevi su neophodni, kako za proučavanje još uvek nepoznatog primarnog mehanizma delovanja dikarboksimida i mehanizma rezistentnosti na njih, tako i za ocenu konkurentske sposobnosti rezistentnih u odnosu na sojeve normalne osetljivosti.

LITERATURA

Akutsu, K., Irino, T., Tsukamoto, T. and Okuyama, S.:

Relationship between development of benomyl-resistant strains and hyphal fusion in *Botrytis cinerea*.

Ann. Phytopathol. Soc. Jap., 53: 495-506, 1987.

Akutsu, K., Tsukamoto, T., Irino, T., and Okuyama, S.:

Transfer of benomylresistance by hyphal fusion of *Botrytis cinerea*.

Ann. Phytopathol. Soc. Jap., 54: 309-316, 1988.

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.

Choi, G. J., Lee, H. J. and Cho, K. J.:

Involvement of Catalase and Superoxide Dismutase in Resistance of *Botrytis cinerea* to Dicarboximide Fungicide

Vinclozolin. Pestic. Biochem. Physiol., 59, 1-10, 1997.

Dekker, J.:

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

Delp, C. J.:

Preface. In: Fungicide Resistance in North America (Delp, C. J., Ed.).

The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA; 1994.

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.

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.

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.

Gouot, 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, Minnesota, USA, 1994, pp. 53-55.

Grindle, M.:

Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*.

J. Gen. Microbiol., 111: 109-120, 1979.

Grindle, M.:

Isolation and characterization of vinclozolin resistant mutants of *Neurospora crassa*.

Transact. Brit. Mycolog. Soc., 82: 634-643, 1984.

Gullino, M. L., and Sisler, H. D.:

Antagonism of Iprodione Toxicity to *Botrytis cinerea* by Mixed Function Oxdase Inhibitors.

Pestic. Sci., 17: 143-149, 1986.

Hansen, H. N., and Smith, R. E.:

The mechanism of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. *Phytopathol.*, 22: 953-964, 1932.

Hayashi, K., Schoonbeek, H., Sugiura, H., and De Waard, M. A.:

Multidrug Resistance in *Botrytis cinerea* Associated with Decreased Accumulation of the Azole Fungicide Oxoconazole and Increased Transcription of the ABC Transporter Gene *BcatrD*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 70: 168-179, 2001.

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.

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., et Gredt, M.:

Etude de l'action in-vitro des fongicides, methode de l'incorporation ou milieu. Laboratoire de Phytopharmacie - INRA, Versailles, 1-10, 1972.

Leroux, P., and Fritz, R.:

Antifungal activity of dicarboximides and aromatic hydrocarbons and resistance to these fungicides. In: *Mode of Action of Antifungal Agents* (Trinci, A. P. J. i Ryley, J. F., eds.). Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, 1983, pp. 207-237.

Littley, E. R., and Rahe, J. E.:

Specific tolerance of *Sclerotium cepivorum* to dicarboximide fungicides. *Plant Dis.*, 68: 371-374, 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.:

Untersuchungen zur morphologischen Variabilität und zur Pathogenität von *Botrytis cinerea* Pers. und *Botryotinia fuckeliana* Whedz. *Z. Pfl. Krankh. Pfl. Schutz*, 90: 622-633, 1983.

Movahedi, S., and Heale, J. B.:

The roles of aspartic proteinase and endopeptin lyase enzymes in the primary stages of infection and phytogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers. *ax Pers. Physiol. Mol. Pathol.*, 36: 303-324, 1990.

Muntanjola-Cvetković, M.:

Opšta mikologija. NIRO „Književne novine”, Beograd, 1987.

Pommer, E. H., and Lorenz, G.:

Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. to dicarboximide fungicides - a literature review. *Crop Protect.*, 1: 221-230, 1982.

Pommer, E. H., and Lorenz, G.:

Dicarboximide fungicides. In: *Modern Selective Fungicides - Properties, Applications, Mechanisms of Action* (Lyr, H., ed.). Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany, 1995, pp. 98-118.

Robertson, J. L., Smith, K. L., Savin, N. E. and Lavigne, R. J.:

Effects of Dose Selection and Sample Size on the Precision of Lethal Dose Estimates in Dose-Mortality Regression. *J. Econ. Entomol.*, 77: 833-837, 1984.

Robertson, J. L., and Preisler, H. K.:

Pesticide Bioassays with Arthropods. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1992.

Shirane, N., Masuko, M., and Hayashi, Y.:

Nuclear behavior and division in germinating conidia of *Botrytis cinerea*. Phytopathol., 78: 1627-1630, 1988.

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.

Stebman, C., De Waard, M. A.:

Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* to triazoles, benomyl and vinclozolin.

Europ. J. Plant. Pathol., 102: 171-180, 1996.

Tanović, B.:

Osetljivost izolata *Botrytis cinerea* Pers. iz različitih domaćina na dikarboksimide.

Pesticidi, 18: 223-235, 2003.

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. Phytopathol., 90: 581-589, 2000.

Yourman, L. F., Jeffers, S. N., and Dean, R. A.:

Phenotype Instability in *Botrytis cinerea* in the Absence of Benzimidazole and Dicarboximide Fungicides.

Phytopathol., 91: 307-315, 2001.

Obtaining Laboratory Strains of *Botrytis cinerea* Pers. Resistant to Dicarboximides by Means of *Crossed-paper* Method

SUMMARY

In order to obtain laboratory strains of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboximides, suitability of *crossed-paper* method was tested. Occurrence of fast-growing mycelium sectors on media amended with iprodione in two different ways; one containing an increasing fungicide concentration, attained by *crossed-paper* method, and the other amended with homogeneous iprodione concentration. Five laboratory highly resistant strains of *B. cinerea* were generated using *crossed-paper* method. No fast-growing mycelium sectors were recorded on medium homogeneously amended with iprodione. Resistance factor (RF) of all the strains obtained was higher than 2000. Four strains out of five retained resistance even after ten subsequent transfers to fungicide free medium.

Key words: *Botrytis cinerea*; *Crossed-paper* method; Dicarboximides; Resistance