

CHARAKTERYSTYKA GRUP FUNGICYDÓW I INDUKTORÓW ODPORNOŚCI STOSOWANYCH W OGRANICZANIU WYSTĘPOWANIA PATOGENÓW ZBÓŻ

Urszula Wachowska✉, Klaudia Goriewa, Adrian Duba
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

Streszczenie. W chemicznej ochronie zbóż stosowane są głównie fungicydy azolowe, morfolinowe, strobilurynowe, benzimidazolowe oraz inhibitory dehydrogenazy kwasu bursztynowego. Fungicydy azolowe i morfolinowe są inhibitorami biosyntezy steroli (SBI). Fungicydy strobilurynowe (QoI) i inhibitory dehydrogenazy kwasu bursztynowego (SDHI) zaburzają proces oddychania grzybów, a benzimidazolowe (MBC) tworzenie β -tubuliny podczas mitozy. W populacjach wielu patogenów zbóż wykryto formy odporne na wszystkie grupy fungicydów, jednak niebezpieczeństwo powstawania tych form dla fungicydów strobilurynowych i benzimidazolowych jest szczególnie duże. Większość fungicydów strobilurynowych wyróżnia się mniejszą trwałością w glebie i większą podatnością na wymywanie. Toksyczność fungicydów wobec *Daphnia magna* określona wskaźnikiem ED_{50} waha się w poszczególnych klasach fungicydów w następujących zakresach: 1,3–51 (azole), 1,3–25 (morfoliny), 0,011–1,3 (strobiluryny), 0,044–100 (SDHI), 0,15–5,4 ml^{-1} (benzimidazole). Sporadycznie literatura opisuje również przypadki endokrynnego działania azoli lub rakotwórczego wpływu benzimidazoli na zwierzęta. Alternatywą dla fungicydów mogą być przyjazne środowisku preparaty indukujące odporność systemiczną roślin (SAR), rzadko stosowane w ochronie zbóż przed patogenami.

Słowa kluczowe: azole, morfoliny, strobiluryny, benzimidazole, inhibitory dehydrogenazy kwasu bursztynowego, odporność patogenów, toksyczność i trwałość fungicydów

WSTĘP

Środki ochrony roślin wykorzystywane w rolnictwie wpływają na patogeny, hamując ich rozwój lub powodując ich zamieranie [Agrios 2005]. Pierwszym wykorzystanym komercyjnie preparatem była „ciecz bordoska”, czyli mieszanina krystalicznego siarczanu

✉wachowska@uwm.edu.pl

miedzi i mleka wapiennego zastosowana przez francuskiego botanika i fitopatologa A. Millardeta do zwalczania mączniaka rzekomego winorośli [Ayres 2004]. Obecnie nie jest możliwe prowadzenie wielkotowarowej produkcji, dostępnej dla szerokiego grona odbiorców, bez stosowania środków ochrony roślin. Liczne badania i praktyka udowodniły, że plony uzyskiwane z upraw właściwie chronionych są większe i mają lepszą jakość od plonów z upraw niechronionych [Podolska i Sułek 2012]. Niestety coraz częściej pojawiają się również prace naukowe opisujące te ksenobiotyki jako zagrożenie dla zdrowia człowieka i środowiska.

Celem opracowania jest scharakteryzowanie najważniejszych grup środków ochrony roślin stosowanych do ochrony zbóż przed patogenami oraz wskazanie na zagrożenia, jakie mogą one stanowić dla środowiska. Wzrost świadomości na temat niekorzystnego oddziaływania tych preparatów na środowisko wśród ich użytkowników może przyczynić się do ograniczenia ich stosowania do przypadków rzeczywistego zagrożenia upraw ze strony patogenów.

FUNGICYDY AZOLOWE

Triazole są największą klasą fungicydów stosowaną powszechnie w medycynie i rolnictwie. Zostały one po raz pierwszy wprowadzone do ochrony roślin w 1973 roku przez firmę Bayer (triadimefon) [Morton i Staub 2008]. W kolejnych latach skomercjalizowano następne substancje z tej grupy, w tym: tebukonazol [1986], epoksykonazol [1990] i protiokonazol [2002], które są obecnie najczęściej stosowane [Parker i in. 2014].

Według klasyfikacji FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), triazole zaliczane są do grupy G1: klasy inhibitorów syntezy steroli (SBI – ang. *sterol biosynthesis inhibitors*) [FRAC Code List 2016]. W klasie heterocyklicznych pochodnych azotu znajdują się także fungicydy pirymidynowe i imidazole należące wraz z triazolami do azoli. Wszystkie wymienione preparaty grzybobójcze hamują syntezę ergosterolu poprzez interakcję z enzymem 14 α -demetylacji w szlaku biosyntezy lanosterolu. Sterole takie jak ergosterol są niezbędne do funkcjonowania i budowy ścian komórkowych grzybów [Parker i in. 2014].

W glebie okres połowicznego rozpadu triazoli wynosi 1,6–120 dni (tab. 1). Istnieje wiele udokumentowanych doniesień o fitotoksycznym działaniu triazoli, szczególnie przy stosowaniu ich podczas małej wilgotności i wysokiej temperatury powietrza [Parker i in. 2014]. Należy jednak zwrócić uwagę na możliwe działania uboczne tych związków. Pewien niepokój budzi zagadnienie odporności patogenów na triazole. Powinowactwo fungicydu do docelowego enzymu może zmniejszyć się na skutek punktowych mutacji w genie *CYP51*, który koduje enzym 14 α -demetylazę. Ilość enzymu, celu działania fungicydu, może się zwiększyć na skutek nadekspresji tego genu. Dodatkowo wpływ triazoli z komórek grzybów może być aktywnie zwiększany w wyniku nadekspresji genów odpowiedzialnych za transportery białkowe. Ponadto możliwe jest wystąpienie innych mutacji, które warunkują oporność patogenów. Te złożone procesy nie są jeszcze do końca poznane. U niektórych gatunków grzybów istnieje wiele kopii genu *CYP51* (np. u *Aspergillus* spp. i *Fusarium* spp.). Ponadto niektóre szczepy odporne wydają się zawierać adaptacje do więcej niż jednego mechanizmu warunkującego odporność. Reis

i inni [2013] wskazują także na obniżenie wrażliwości patogenu *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* na triadimenol, który zastosowany został do zaprawiania ziarna pszenicy. U patogenów porażających pszenicę (*Oculimacula yallundae*, *Blumeria graminis*, *Puccinia tritici*, *Zyloseptoria tritici* oraz *Fusarium* spp.) stwierdzono występowanie mutacji w genie *CYP51*, co skutkuje obniżeniem wrażliwości tych patogenów na triazole [Parker i in. 2014]. Badania Klix i innych [2007] wykazały, że porażające kłosa pszenicy izolaty grzyba *Gibberella zeae* pochodzące z 1987 roku były wrażliwsze na epoksykonazol niż izolaty z 2004 roku. Cytowani autorzy udowodnili ponadto, że dynamika spadku wrażliwości tego patogenu wynosiła 0,22% rocznie.

Tabela 1. Wybrane azole stosowane w chemicznej ochronie roślin (na podstawie FRAC, Fungicide Resistance Action Committee, PPDB, Pesticide Properties DataBase)

Table 1. Selected azoles used in chemical plant protection (based on FRAC, Fungicide Resistance Action Committee, PPDB, Pesticide Properties DataBase)

Azole Azoles	Stosowane w rolnictwie Used in chemical plant protection	DT ₅₀ * [dni] DT ₅₀ [days]	K _{foc} ** [ml·g ⁻¹]	EC ₅₀ *** [mg·l ⁻¹]
Imidazole	imazalil	6,4	4753	3,50
	prochloraz	16,7	1440	4,30
	triadimenol	64,9	273	51,00
Triazole	triadimefon	brak danych no data	749	7,16
	tebukonazol	47,1	769	2,79
	epoksykonazol	120	1073	8,69
	protiokonazol	1,6	2556	1,3

* Współczynnik połowicznego rozpadu w glebie DT₅₀, substancje o współczynniku DT₅₀ > 20 uznawane są za trwałe; ** współczynniki adsorpcji i mobilności w glebie K_{foc} definiuje się jako stosunek substancji aktywnej w glebie do stężenia tej substancji w fazie wodnej w stanie równowagi, jeśli jest < 500 ml·g⁻¹ substancja uznawana jest za łatwo wymywaną z gleby; *** toksyczność EC₅₀ oznaczona jako stężenie efektywne (ang. *effective concentration*) danej toksyny w środowisku, które wywołuje efekt u 50% osobników *Daphnia magna*.

* Soil degradation half-life DT₅₀, substances with DT₅₀ > 20 are considered to be stable; ** soil adsorption and mobility coefficients K_{foc} are defined as the ratio of the active substance in the soil to the concentration of the substance in the equilibrium water phase, if < 500 ml·g⁻¹ substance is considered to be elutable; *** toxicity determined as toxin effective concentration in the environment, which effects 50% of *Daphnia magna* population.

Niestety w literaturze opisywane są również hepatotoksyczne właściwości niektórych triazoli. Podawanie gryzoniom dużych dawek tych związków może prowadzić do wzrostu masy wątroby, a w długoterminowych badaniach toksyczności niektóre triazole (ciprokonazol i epoksykonazol) powodowały powstawanie guzów raka wątrobowo-komórkowego [Heise i in. 2014]. Zhu i inni [2014] oceniając toksyczność fungicydów triazolowych (myklobutanilu, flukonazolu, flusilazolu, triflumizolu i epoksykonazolu) na rozwój embrionów ryby *Gobiocypris rarus* na poziomie aktywności enzymów (m.in. dysmutazy ponadtlenkowej), oszacowali wartości EC₅₀ na poziomie 3–12 mg·l⁻¹. Wskaźnik EC₅₀ w badaniach, w których organizmem docelowym była *Daphnia magna*, oszacowano na poziomie od 1,3 (protiokonazol) do 51 (triadimenolu) – tabela 1. Badania Taxvig i innych (2007) dowiodły także, że tebukonazol i epoksykonazol mogą działać na

układ endokryny szczurów, na co wskazywała między innymi feminizacja samców lub zwiększenie masy urodzeniowej tych zwierząt.

Azole rzadko są uznawane za trwałe ksenobiotyki, ale mają tendencję do zalegania w glebie, ponieważ nie są podatne na wymywanie i przemieszczanie się wraz z wodą (tab. 1). W badaniach Kim i innych [2002] wykazano, że pozostałości propikonazolu po jego aplikacji utrzymywały się w górnych warstwach gleby i jego duża część wiązała się z agregatami gleby, dlatego też związek ten należy uznać za długo zalegający w środowisku (okres połowicznego rozkładu jest szacowany na 214 dni).

CHARAKTERYSTYKA FUNGICYDÓW MORFOLINOWYCH

W latach 80. XX wieku fenpropimorf stał się bardzo popularnym fungicydem, podobnie jak inne pochodne morfoliny, dimetomorf i tridemorf, stosowane do ochrony zbóż [Morton i Staub 2008]. Według klasyfikacji FRAC, ta klasa fungicydów należy do grupy G2: inhibitorów biosyntezy steroli [SBI – ang. sterol biosynthesis inhibitors]. Blokowanie enzymu $\Delta^{8,7}$ -izomerazy prowadzi do zahamowania procesu izomeryzacji fekosterolu do episterolu, co uniemożliwia powstawanie ergosterolu, istotnego składnika ściany komórkowej grzybów [FRAC Code List 2016]. Jest to działanie charakterystyczne dla substancji aktywnych morfoliny, które ponadto hamują aktywność Δ^{14} -reduktazy. Toksyczność fungicydów morfolinowych względem grzybów jest efektem nadmiernego gromadzenia prekursorów steroli oraz jednoczesnym zmniejszeniem zawartości jednego z głównych steroli ergosterolu w tkankach grzybów.

Tabela 2. Wybrane fungicydy morfolinowe stosowane w chemicznej ochronie roślin (na podstawie FRAC, Fungicide Resistance Action Committee, PPDB, Pesticide Properties DataBase)

Table 2. Selected morpholine fungicides used in chemical plant protection (based on FRAC, Fungicide Resistance Action Committee, PPDB, Pesticide Properties DataBase)

Grupa chemiczna Chemical group	Stosowane w rolnictwie Used in chemical plant protection	DT ₅₀ * [dni] DT ₅₀ * [days]	K _{loc} ** [ml·g ⁻¹]	EC ₅₀ *** [mg·l ⁻¹]
Piperydyny	fenpropidyna	49,2	3808	0,54
	fenpropimorf	25,5	4382	2,24
Morfoliny	triforina	21	brak danych no data	25
	tridemorf	24	brak danych no data	1,3
	dimetomorf	44	348	10,6

Objaśnienia jak w tabeli 1.

Explanations as in Table 1.

Już w 1988 roku we wschodnich rejonach Szkocji i Anglii odnotowano występowanie odpornych na fenpropimorf form *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* [Brown i in. 1991]. Głównymi mechanizmami odpowiedzialnymi za nabywanie odporności przez patogeny na fungicydy morfolinowe są mutacje punktowe o charakterze substytucji.

Wartość EC_{50} dla fungicydów morfolinowych mieści się w zakresie 0,54–25 $mg \cdot l^{-1}$, a okres połowicznego rozpadu dla tych związków wynosi 21–49,2 dni (tab. 2). Niestety fungicydy morfolinowe wykazują także znaczne powinowactwo do $\sigma 1$ -receptorów, które przeważają w centralnym układzie nerwowym. Dokładny charakter miejsc wiązania nie jest znany, ale wiadome jest, że receptory te są związane z występowaniem psychoz, schizofrenii, depresji klinicznej i uzależnień od kokainy [Ivanova i in. 2014]. Poziom toksyczności fungicydów morfolinowych wobec zwierząt jest niski. Fenpropimorf działa drażniąco na skórę w badaniach na królikach. Tridemorf oraz fenpropimorf mogą prowadzić do zaburzeń wzrostu i rozwoju (zwiększenie częstotliwości wad rozwojowych) [Gupta 2011].

FUNGICYDY STROBILURYNOWE

W 1977 roku odkryto pierwszą naturalnie występującą strobilurynę A wytwarzaną przez grzyb *Strobilurus tenacellus* [Sauter i in. 1999]. Syntetyczne strobiluryny weszły do powszechnego stosowania w latach 90. i od tego czasu cieszą się dużą popularnością. Strobiluryny nie tylko zwalczają liczne patogeny, ale wpływają również na wzrost plonowania roślin poprzez między innymi hamowanie syntezy etylenu oraz uznawane są za relatywnie przyjazne dla środowiska [Morton i Staub 2008]. W 1996 roku zarejestrowano pierwszy fungicyd zawierający azoksystrobinę, od tego czasu zsyntetyzowano i skomercjalizowano co najmniej 19 takich substancji [Wu i in. 2014] – tabela 3.

Fungicydy strobilurynowe na liście FRAC sklasyfikowane są do grup C3: QoI (ang. quinone outside inhibitors) [FRAC Code List 2016]. Preparaty strobilurynowe hamują oddychanie mitochondrialne komórek grzybów poprzez wiązanie się do koenzymu ubichinonu w cytochromie b i c1 (kompleks enzymów III). Blokuje to transport elektronów między cytochromem b i cytochromem c1, prowadząc do niedoboru energii w komórkach poprzez zmniejszenie produkcji ATP [Wachowska 2010]. Chociaż fungicydy typu QoI mogą skutecznie ograniczać szerokie spektrum ważnych patogenów roślin z typów *Basidiomycota*, *Ascomycota* i *Oomycota*, to ich przydatność została mocno ograniczona przez pojawienie się patogenów odpornych na te związki. Mechanizm powstawania odporności na fungicydy QoI obejmuje mutacje punktowe albo wzrost transportu elektronów przez alternatywny szlak oksydacyjny, jednak ten ostatni proces jest mało wydajny i praktycznie nie ma znaczenia w uprawach polowych [Gisi i in. 2002]. Najczęściej występująca mutacja punktowa polega na substytucji w kodonie 143 glicyny na alaninę (Gly143Ala) w genie *CYTB* [Sierotzki i in. 2000].

Według kart charakterystyki produktów najmniejszą wartością EC_{50} dla *Daphnia magna* charakteryzuje się trifloksystrobina (0,011 $mg \cdot l^{-1}$), a na drugim biegunie znajduje się orysastrobina z wartością EC_{50} na poziomie 1,3 $mg \cdot l^{-1}$ (tab. 3). Substancje czynne fungicydów strobilurynowych charakteryzują się zróżnicowaną trwałością w glebie, co uzależnione jest od rodzaju gleby. Okres połowicznego rozkładu azoksystrobiny w glebie wynosi 180,7 dnia, a trifloksystrobiny zaledwie 7 dni (tab. 3). Ich toksyczne oddziaływanie na organizmy w środowisku również jest na ogół małe. Dowiodły tego badania Hooser i innych [2012], w których wskaźniki dawki śmiertelnej (ang. lethal dose) LC_{50} ($\mu g \cdot l^{-1}$) po 72-godzinnej ekspozycji *Bufo cognatus* na kilka fungicydów zawierających związki

Tabela 3. Wybrane strobiluryny stosowane w chemicznej ochronie roślin (na podstawie Wachowska [2010], FRAC, Fungicide Resistance Action Committee, PPDB, Pesticide Properties DataBase)

Table 3. Selected strobilurins used in used in chemical plant protection (based on Wachowska [2010], FRAC, Fungicide Resistance Action Committee, PPDB, Pesticide Properties DataBase)

Strobiluryny Strobilurins	Stosowane w rolnictwie Used in chemical plant protection	DT ₅₀ * [dni] DT ₅₀ * [days]	K _{foc} ** [ml·g ⁻¹]	EC ₅₀ *** [mg·l ⁻¹]
Metoksyakrylaty	azoksystrobina	180,7	423	0,230
	pikoksystrobina	20	898	0,024
Metoksykarbaminiany	pyraklostrobina	32	9315	0,016
Oksyiminooctany	krezoksym metylowy	brak danych no data	308	0,186
	trifloksystrobina	7	2377	0,011
Oksyimiono- octanoamidy	metominostrobina	brak danych no data	brak danych no data	0,680
	dimoksystrobina	22,9	486	0,039
	orysastrobina	55	brak danych no data	1,300
Dihydrodioksazyny	fluoksastrobina	77	848	0,480

Objaśnienia jak w tabeli 1.

Explanations as in Table 1.

strobilurynowe oszacowano na poziomie 3,7 (pyraklostrobina), 1029 (azoksystrobina) i 100 (trifloksystrobina). Także w badaniach Ochoa-Acuña i innych [2009] pyraklostrobina była najbardziej toksyczna dla *Daphnia magna* po 96 h ekspozycji w porównaniu z innymi fungicydami strobilurynowymi. Po 15 dniach traktowania ryb fungicydami strobilurynowymi obserwowano morfologiczne i funkcjonalne zmiany w wątrobie i śmierć 49% osobników [Levina i in. 2012].

FUNGICYDY TYPU INHIBITORY DEHYDROGENAZY KWASU BURSZTYNOWEGO (SDHI)

W ostatnich latach nastąpił wzrost popularności fungicydów SDHI (ang. succinate dehydrogenase inhibitor), które blokują aktywność dehydrogenazy kwasu bursztynowego. Wśród substancji aktywnych wymienia się te, które już od lat 70. XX wieku są dostępne na rynku (np. karboksyna, fenfuram), a także inne nowo zsyntetyzowane związki [FRAC Code List 2016]. Obecnie najpopularniejszą substancją aktywną na świecie jest boskalid, a w Polsce, obok boskalidu, stosuje się na dużą skalę biksafen, fluopyram, izopyrazam, pentiopyrad (tab. 4).

Tabela 4. Wybrane fungicydy inhibitora dehydrogenazy kwasu bursztynowego stosowane w chemicznej ochronie roślin (na podstawie FRAC, Fungicide Resistance Action Committee, PPDB, Pesticide Properties DataBase)

Table 4. Selected succinate dehydrogenase inhibitor fungicides used in chemical plant protection (based on FRAC, Fungicide Resistance Action Committee, PPDB, Pesticide Properties DataBase)

Grupa chemiczna Chemical group	Stosowane w rolnictwie Used in chemical plant protection	DT ₅₀ * [dni] DT ₅₀ * [days]	K _{loc} ** [ml·g ⁻¹]	EC ₅₀ *** [mg·l ⁻¹]
Pirydino- -karboksamid	boska lid	118	772	5,33
	biksafen	254	3869	1,2
Pirazolo- -4-karboksamidy	izopyrazm	72	2416	0,044
	pentiopyrad	9,2	761	1,38
Pyridyletylamidy	fluopyram	118,8	278,9	100
Oksatinokarboksy- amidowe	karboksyna	3,3	1,3	57
Furanokarboksamidy	fenfuran	brak danych no data	brak danych no data	brak danych no data

Objaśnienia jak w tabeli 1.

Explanations as in Table 1.

Zgodnie z klasyfikacją FRAC, fungicydy SDHI zaliczane są do fungicydów grupy C2: oddziałujących na kompleks dehydrogenazy bursztynianowej w łańcuchu oddechowym (kompleks II), w miejscu wiązania ubichinonu. W wyniku zakłócenia transportu elektronów zostaje zahamowane oddychanie mitochondrialne [FRAC Code List 2016]. Stosowanie preparatów SDHI na dużą skalę zwiększa ryzyko występowania genetycznie uwarunkowanej odporności. Według organizacji FRAC, ryzyko występowania odporności na fungicydy SDHI jest na poziomie średnim lub wysokim [FRAC 2015, FRAC Code List 2016]. Do patogenów zbóż, u których wykryto odporność na fungicydy SDHI, zaliczamy między innymi: *Zymoseptoria tritici* [Torriani i in. 2015], *Ustilago nuda* i *Pyrenophora teres* [Sierotzki i Scalliet 2013].

Nabywanie odporności przez patogeny wynika z występowania mutacji punktowych w genach podjednostek B, C i D kodujących dehydrogenazę bursztynianową [Avenot i Michailides 2010]. Wszystkie powstałe mutacje znajdują się wewnątrz lub w pobliżu miejsca wiążącego ubichinon, co powoduje zmniejszenie lub utratę jego powinowactwa do fungicydów.

Zaobserwowano, że popularny boskalid jest związkiem mało mobilnym, mogącym niekorzystnie wpływać na przemiany fosforu i węgla (tab. 4). Może również zaburzać procesy oddechowe w glebie [Xiong i in. 2015]. Według kryteriów OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) boskalid to związek, który trudno ulega biodegradacji, według FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) okres ten może wynosić nawet 545 dni [FAO 2009, OECD 2011]. Dawka LD₅₀ w zależności od sposobu dostania się do organizmu może być różna: dla doustnego podania

wynosi powyżej 5000 mg·kg⁻¹, dla inhalacyjnego 6,7 mg·l⁻¹ w ciągu 4 h, dla dermalnego powyżej 2000 mg·kg⁻¹. Steżenie śmiertelne [LC₅₀] dla ryb z gatunku *Oncorhynchus mykiss* wynosi 2,7 mg·l⁻¹ (czas ekspozycji 96 h), a LC₅₀ dla *Daphnia magna* wynosi 5,33 mg·l⁻¹ (48 h) [CDPR 2003, EPA 2003, FSC 2004].

FUNGICYDY BENZIMIDAZOŁOWE I TIOFANATY

Fungicydy benzimidazolowe i tiofanaty zostały wprowadzone na rynek w 1960 roku, a na początku 1970 roku zakres ich stosowania obejmował zabiegi nalistne, zaprawianie nasion, stosowano je także po zbiorach [Morton i Staub 2008]. Jednymi z pierwszych stosowanych substancji był benomyl oraz tiofanat metylu, ten ostatni stosowany obecnie także w uprawie zbóż [Wachowska i in. 2012].

Na liście FRAC fungicydy benzimidazolowe i tiofanaty znajdują się w klasie B1: związków zaburzających tworzenie β-tubuliny podczas mitozy (MBC – ang. methyl benzimidazole carbamate) [FRAC Code List 2016]. Celem ataku benzimidazoli i tiofanatów w komórce grzybów jest pojedyncze miejsce w podjednostce β-tubuliny. Mutacja w jednym punkcie genu kodującym β-tubulinę prowadząca do substytucji aminokwasu w pozycji 198 (Glu198Ala) powoduje utratę możliwości wiązania fungicydu do podjednostek β-tubuliny, czego konsekwencją jest duża odporność patogenów na te fungicydy. W komórkach patogenów mogą pojawiać się również dodatkowe mutacje genu β-tubuliny związane z opornością na fungicydy MBCs w pozycjach 167, 198, 200 i 240, na przykład Glu198Lys, Phe200Tyr [Hahn 2014]. Pierwszy przypadek występowania odporności u patogenu mączniaka prawdziwego na benzimidazole zgłoszono w 1969 roku, a do 2014 roku takich patogenów było co najmniej kilkanaście, w tym patogeny zbóż: *Zymoseptoria tritici*, *Oculimacula* spp., *Puccinia striiformis*, *Rhynchosporium secalis*, *Pyrenophora teres*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Gibberella zeae* [Liu et al. 2014].

Tabela 5. Wybrane benzimidazole i tiofanaty stosowane w chemicznej ochronie roślin (na podstawie FRAC, Fungicide Resistance Action Committee, PPDB, Pesticide Properties DataBase)

Table 5. Selected benzimidazoles and thiophanates used in chemical plant protection (based on FRAC, Fungicide Resistance Action Committee, PPDB, Pesticide Properties DataBase)

Grupa chemiczna Chemical group	Stosowane w rolnictwie Used in chemical plant protection	DT ₅₀ * [dni] DT ₅₀ * [days]	K _{loc} ** [ml·g ⁻¹]	EC ₅₀ *** [mg·l ⁻¹]
Tiofanaty	tiofanat metylu	5	brak danych no data	5,4
	karbendazym	22	225	0,15
Benzimidazole	tiabendazol	724	2091	0,81
	benomyl	brak danych no data	brak danych no data	0,28

Objaśnienia jak w tabeli 1.

Explanations as in Table 1.

Benzimidazole i tiofanaty na ogół charakteryzują się małą wartością wskaźnika EC_{50} , wyjątkiem jest popularny tiofanat metylu (tab. 5). Fungicydy tego typu mogą mieć potencjalny wpływ zarówno na środowisko, jak i zdrowie człowieka. Mimo że ostre efekty toksyczne tych związków są rzadkie, ze względu na ich dużą wartość $LD - LC_{50}$, odnotowano kilka toksycznych efektów związanych z długotrwałą ekspozycją na te związki: działanie teratogenne, poliploidalność, biegunka, anemia, obrzęki płuc [Danaher i in. 2007]. U szczurów dawka śmiertelna dla 50% osobników wynosi $6400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (podawana bezpośrednio do żołądka), karbendazym akumulowany jest w wielu narządach, między innymi w wątrobie i gonadach [Lutz 2012]. Ponadto większość pochodnych benzimidazoli wykazuje dużą toksyczność wobec komórek wątroby, co prawdopodobnie jest wynikiem przemian biochemicznych w wątrobie, w wyniku których powstają toksyczne związki. Głównym związkiem oddziaływującym toksycznie na wątrobę jest tiabendazol wyróżniający się długim okresem połowicznego rozkładu DT_{50} [Lutz 2012, tab. 5]. Trwałość tiofanatu metylu w glebie jest uzależniona od aktywności bakterii glebowych. Oszacowano ją na poziomie średnio 5 dni [Cycoń i in. 2011, tab. 5].

INDUKTORY ODPORNOŚCI ROŚLIN STOSOWANE W OCHRONIE ZBÓŻ PRZED PATOGENAMI

Alternatywą dla fungicydów mogą być preparaty indukujące naturalny mechanizm obronny roślin, czyli ich odporność systemiczną (SAR). W ostatnich latach preparaty biotechniczne cieszą się coraz większą popularnością ze względu na coraz większą troskę człowieka o środowisko. Mogą być stosowane we wszystkich fazach rozwoju roślin, chroniąc je przed patogenami z królestw Fungi i Bacteria [Sapieha-Waszkiewicz i in. 2010]. Podstawą indukowania odporności systemicznej są związki-induktory, które noszą nazwę elicytorów. Induktorami odporności systemicznej roślin są: kwas salicylowy (SA), kwas 2,6-dichloroizoniczynowy (INA) i kwas 3-aminomasłowy (GABA). Związki te nie mają negatywnego wpływu na środowisko i nie prowadzą do powstania uodpornionych form patogenów [Khan i in. 2015]. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) 1107/2009, a także ustawa z 2013 roku o środkach ochrony roślin stanowią o zobowiązaniach krajów członkowskich UE do preferencyjnego traktowania w integrowanej ochronie roślin środków ochrony roślin o charakterze niechemicznym, ekologicznym i naturalnym. Do takich związków można zaliczyć induktory odporności roślin.

W 1996 roku został opracowany i wprowadzony na rynek pionierski związek należący do związków benzotiadiazolowych (BTHS) – acibenzolar-S-metylu. Związek ten nie wykazuje znaczącej aktywności inhibicyjnej wobec fitopatogennych grzybów i bakterii. Zamiast tego wywołuje SAR w odpowiedzi na patogeny i chroni, na przykład pszenicę, przed infekcją *B. graminis* [Stadnik i Buchenauer 2000].

W latach 80. XX wieku chitozan (β -[1,4]-2-amino-2-deoksy-D-glukoza), polimer naturalnie występujący w zewnętrznych szkieletach skorupiaków i owadów, stał się dostępny w ilościach przemysłowych i zaczął być stosowany w rolnictwie. Jak wykazały badania Menga i innych [2010], chitozan w dawce $5,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ hamował kiełkowanie zarodników *Alternaria kikuchiana* i *Physalospora piricola* w warunkach *in vitro*. W testach biologicz-

nych dowiedziono, że pochodne N-[benzyl] chitozanu silnie hamują rozwój zarodników *Fusarium oxysporum* i *Pythium debaryanum* [Rabea i in. 2009]. W opracowaniu Xinga i innych [2014] opisano kilka mechanizmów antymikrobiologicznego działania chitozanu: (1) jego dodatnio naładowane cząsteczki mogą potencjalnie oddziaływać z ujemnie naładowaną powierzchnią patogenu, niszcząc jego strukturę komórkową, (2) związek ten może wiązać się z DNA i hamować syntezę RNA (mRNA) i białka, (3) chitozan jest w stanie chelatować niektóre istotne dla patogenów odżywcze jony metali i pierwiastki śladowe, przez co stają się one niedostępne dla patogenów. Ponadto chitozan ma także unikalne właściwości pobudzania mechanizmów obronnych roślin i w rezultacie zwiększa wydajność indukcji śmierci komórkowej oraz zamykania aparatów szparkowych w trakcie infekcji roślin przez patogeny. W komórkach roślin w warunkach stresu biotycznego następują także inne zmiany, między innymi tworzą się reaktywne formy tlenu (ROS), kaloza, pojawiają się białka PR (ang. pathogenesis-related proteins) i fitoaleksyny. Chitozan jako zewnętrzny elicytor zwiększa także aktywność amoniakolizy fenyloalaniny (PAL), peroksydazy, oksydazy polifenolowej, katalazy i dysmutazy nadmanganowej [Xing i in. 2014].

Badania toksyczności dla chitozanu wykazały, że LD_{50} dla myszy przekracza wartość 16 g·dzień⁻¹·kg masy ciała i jest zbliżona do soli i cukru [Singla i Chawla 2001].

LITERATURA

- Agrios G.N., 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic, Burlington, MA.
- Avenot H.F., Michailides T.J., 2010. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 29, 643–651.
- Ayres P.G., 2004. Alexis Millardet: France's forgotten mycologist. *Mycologist* 18(1), 22–26.
- Brown J.K., Slater S.E., See K.A., 1991. Sensitivity of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* to morpholine and piperidine fungicides. *Crop Protection* 10(6), 445–454.
- CDPR (California Department of Pesticide Regulation), 2003. Boscalid. Public Report 2003-8.
- Cycoń M., Wójcik M., Piotrowska-Seget Z., 2011. Biodegradation kinetics of the benzimidazole fungicide thiophanate-methyl by bacteria isolated from loamy sand soil. *Biodegradation* 22, 573–583.
- Danaher M., De Ruyck H., Crooks S.R.H., Dowling G., O'Keeffe M., 2007. Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *J. Chromatogr. B* 845, 1.
- EPA (Environmental Protection Agency), 2003. Pesticide Fact Sheet. Boscalid. [online] http://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-128008_01-Jul-03.pdf [dostęp: 21.01.2016].
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2009. Pesticide residues in food–2009. Evaluation. Part I. Residues. FAO Plant Production and Protection Paper 198, 134–145.
- FRAC Code List, 2016. Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering) [online]: <http://frac.info/> [dostęp: 25.02.2016].

- FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), 2015. List of Species Resistant to SDHIs. [on-line] <http://frac.info/> [dostęp: 22.12.2015].
- FSC (Food Safety Commission), 2004. Evaluation Report. Boscalid. [online]: https://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/pesticide/boscalid_full_170411.pdf [dostęp: 24.01.2016].
- Gisi U., Sierotzki H., Cook A., McCaffery A., 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58, 859–867.
- Gupta R.C., 2011. Reproductive and developmental toxicology. Academic Press.
- Hahn M., 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *J. Chem. Biol.* 7(4), 133–141.
- Heise T., Schmidt F., Knebel C., Rieke S., Haider W., Pfeil R., Kneuer C., Niemann L., Marx-Stoelting P., 2014. Hepatotoxic effects of (tri)azole fungicides in a broad dose range. *Arch. Toxicol.* doi 10.1007/s00204-014-1336-1.
- Hooser E.A., Jason B. Belden J.B., Loren M. Smith L.M., McMurry S.T., 2012. Acute toxicity of three strobilurin fungicide formulations and their active ingredients to tadpoles. *Ecotoxicology* 21, 1458–1464.
- Ivanova B., Spiteller M., 2014. Quantitation of heterogeneous formulations of morpholine-type fungicides and surfactants in polluted soils. *Water Air Soil Pollut.* 225, 1918, doi 10.1007/s11270-014-1918-9.
- Khan M., H.Z. Mahmood, Damalas C.A., 2015. Pesticide use and risk perceptions among farmers in the cotton belt of Punjab, Pakistan. *Crop Prot.* 67, 184–190.
- Kim I.S., Beaudette L.A., Shim J.H., Trevors J.T., Suh Y.T., 2002. Environmental fate of the triazole fungicide propiconazole in a rice-paddy-soil lysimeter. *Plant and Soil* 239, 321–331.
- Klix M. B., Verreet J. A., Beyer M., 2007. Comparison of the declining triazole sensitivity of *Gibberella zeae* and increased sensitivity achieved by advances in triazole fungicide development. *Crop Protection* 26(4), 683–690.
- Levina I.L., Fedorova E.A., Kuznetsova Y.L., Zinchuk O.A., 2012. Dynamics of antioxidant protection and detoxication processes affected by strobilurin fungicides in the liver of cyprinids. *Inland Water Biology* 5(2), 222–228.
- Liu Y., Chen X., Jiang J., Hamada M.S., Yin Y., Ma Z., 2014. Detection and dynamics of different carbendazim-resistance conferring β -tubulin variants of *Gibberella zeae* collected from infected wheat heads and rice stubble in China. *Pest Manag. Sci.* 70(8), 1228–1236.
- Lutz P., 2012. Benzimidazol i jego pochodne – od fungicydów do narkotyków zmodyfikowanych. Nowe zagrożenia zawodowe i środowiskowe. *Medycyna Pracy* 63(4), 505–513.
- Meng X.H., Yang L.Y., Kennedy J.F., Tian S.P., 2010. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydr. Polym.* 81, 70–75.
- Morton V., Staub T., 2008. A short history of fungicides. *APSnet Features*, doi 10.1094.
- Ochoa-Acuña H.U., Bialkowski W., Yale G., Hahn L., 2009. Toxicity of soybean rust fungicides to freshwater algae and *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 18, 440–446.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2011. OECD MRL Calculator: spreadsheet for single data set and spreadsheet for multiple data set. 2 March 2011. Pesticide Publications/Publications on Pesticide Residues.
- Parker J.E., Warrilow A.G.S., Price C.L., Mullins J.G., Kelly D.E., Kelly S.L., 2014. Resistance to antifungals that target CYP51. *J. Chem. Biol.* 7, 143–161.

- Podolska G., Sułek A., 2012. Wpływ intensywności uprawy na plon i cechy struktury plonu odmian pszenicy ozimej. *Pol. J. Agron.* 11, 41–46.
- Rabea E.I., Badawy M.E.I., Steurbaut W., Stevens C.V., 2009. *In vitro* assessment of N-(benzyl)chitosan derivatives against some plant pathogenic bacteria and fungi. *Eur. Polym. J.* 45, 237–245.
- Reis E.M., Basso D. F., Zanatta M., 2013. Loss of sensitivity of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* to triadimenol applied as seed treatment. *Trop. Plant Pathol.* 38(1), 55–57.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. dotyczącym dopuszczania do obrotu środków ochrony roślin i uchylające dyrektywę Rady 79/117/EWG i 91/414/EWG. *Dz.U. UE L* 309/1.
- Sapiecha-Waszkiwicz A., Marjańska-Cichoń B., Miętkiewski R., 2010. Porównanie wpływu preparatów biotechnicznych Bioczos S, Biosept 33 SL i syntetycznych pestycydów na kiełkowanie zarodników grzybów owadobójczych. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* 46, 117–125.
- Sauter H., Steglich W., Anke T., 1999. Strobilurine: evolution einer neuen wirkstoffklasse. *Angew. Chemie.* 111, 1416–1438.
- Sierotzki H., Parisi S., Steinfeld U., Tenzer I., Poirey S., Gisi, U., 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Manag. Sci.* 56(10), 833–841.
- Sierotzki H., Scalliet G., 2013. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology* 103(9), 880–887.
- Singla A.K., Chawla M., 2001. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 1047–1067.
- Stadnik M.J., Buchenauer H., 2000. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 57, 25–34.
- Taxvig C., Hass U., Axelstad M., Dalgaard M., Boberg J., Andeasen H.R., Vinggaard A.M., 2007. Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicological Sci.* 100(2), 464–473.
- Torriani S.F., Melichar J.P., Mills C., Pain N., Sierotzki H., Courbot M., 2015. *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Gen. Biol.* 79, 8–12.
- Ustawa z dnia 8 marca 2013 r. o środkach ochrony roślin. *Dz.U.* 2013, poz. 455.
- Wachowska U., 2010. Charakterystyka fungicydów strobilurynowych z uwzględnieniem problemu odporności fitopatogenów (artykuł przeglądowy). *Post. Nauk Roln.* 30, 77–88.
- Wachowska U., Mikołajczyk W., Kucharska K., 2012. Skuteczność tebukonazolu i tiofanatu metylu w ograniczaniu rozwoju patogenów rodzaju *Fusarium* na kłosach pszenicy ozimej. *Prog. Plant Prot.* 52(3), 671–675.
- Wu D.X., Zhang X.K., Wang J., Wang J.X., Ming-Guo Zhou M.G., Chang-Jun Chen C.J., 2014. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* and risk assessment of developing resistance to the novel fungicide Y5247. *Australasian Plant Pathol.* 43, 639–651.
- Xing K., Zhu X. Peng X. Qin S., 2014. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agron. Sustain. Dev.*, doi 10.1007/s13593-014-0252-3.
- Xiong C., Adney W.S., Vinzant T.B., Chou Y.C., Himmel M.E., Thomas S.R., 2015. Succinate dehydrogenase: an ideal target for fungicide discovery. W: P. Maienfisch, Th.M. Stevenson (red.). *Discovery and Synthesis of Crop Protection Products*, 175–195.
- Zhu B., Liu L., Gong Y.X., Ling F., Wang G.X., 2014. Triazole-induced toxicity in developing rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 13625–13635.

FUNGICIDES AND PLANT RESISTANCE INDUCERS – INDISPENSABLE FOR CONTROLLING CEREAL PATHOGENS, DETRIMENTAL TO THE ENVIRONMENT

Summary. Major fungicides groups used in chemical plant protection are: azoles, morpholines, strobilurins (QoI), benzimidazoles and thiophanates (MBC) and succinate dehydrogenase inhibitors (SDHI). In recent years, SDHI popularity continues to grow because of its efficiency. Among active SDHI chemicals there are long-known substances, e.g. carboxin, fenfuram and new synthesized compounds. Modes of action of each fungicide groups are different and their classification is based on specific active compounds mechanism of action. Azole and morpholine fungicides are inhibitors of sterol synthesis. One of the main sterols in fungal cells is ergosterol which is an important building compound in cell wall. Ergosterol is necessary to maintain cell membranes proper functions. Strobilurins and succinate dehydrogenase inhibitors interrupt respiratory chain in fungal cells by blocking electrons transfer. Strobilurins connect with ubiquinone coenzyme in cytochrome b and c1 whereas SDHI connect with succinate dehydrogenase complex. Benzimidazoles and thiophanates inhibit synthesis of β -tubulin during mitosis. Crop pathogens resistance to all these active compounds has been discovered so far. The most serious hazard of pathogen resistance acquisition is a characteristic of benzimidazole and strobilurin fungicides. There is high probability of forming resistant pathogens due to new fungicides production. There are four major resistance mechanisms in fungi: (1) change in target site (mutations), (2) metabolic detoxification of active substance, (3) production of the additional enzyme target site, (4) removal of the target site. Durability in soil is determined by half-life time (DT_{50}) of active compounds: azoles 1.6–120, morpholines 21–49.5, strobilurins 7–180.5, SDHI 3.5–118.8, benzimidazoles and thiophanates 5–724 days. Short period of half-life time of selected strobilurins is linked with susceptibility to eluviation. Fungicides toxicity to *Daphnia magna* is defined as EC_{50} index which varies between each group of fungicides, e.g.: azoles 1.3–51, morpholines 1.3–25, strobilurins 0.011–1.3, SDHI 0.044–100, benzimidazoles 0.15–5.4 ml L⁻¹. However, several case reports of azoles endocrine and benzimidazoles carcinogenic effects on animals have been reported. Environmentally friendly alternative for chemical plant protection are preparations inducing systemic acquired resistance (SAR). Salicylic acid (SA), 2,6-dichloroisonicotinic acid and gamma-aminobutyric acid (GABA) and chitosan are inducers (called elicitors) of SAR in plants. The main advantage of preparations containing elicitors is no risk of pathogen resistant forms spread. So far, such preparations are not often used in crops protection.

Key words: azoles, morpholines, strobilurins, benzimidazoles, succinate dehydrogenase inhibitors, pathogen resistance, toxicity and persistence of fungicides

