

Aktualne możliwości i perspektywy wykorzystania fungicydów w leśnictwie

Current possibilities and prospects of using fungicides in forestry

Adam Okorski^{1*}, Agnieszka Pszczółkowska¹, Tomasz Oszako², Justyna A. Nowakowska³

¹Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Katedra Diagnostyki i Patofizjologii Roślin, pl. Łódzki 5, 10-727 Olsztyn;
Instytut Badawczy Leśnictwa, ²Zakład Ochrony Lasu, ³Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych, Sękocin Stary,
ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn, Polska

*Tel. +48 89 5233511, e-mail: adam.okorski@uwm.edu.pl

Abstract. The possibility of using chemicals in European forestry is extremely limited due to the binding legal regulations and specific conditions concerning the market of plant protection products. This is reflected in the limited availability of active fungicides in forestry. Due to this limitation, practitioners using fungicides in forest nurseries and forest cultivation must have substantial knowledge of the biology of pathogens to ensure satisfactorily effective protection.

The work presented here provides an overview of the currently recommended fungicides in Polish forestry as well as the mechanisms of interaction between the active substances and the pathogen, the plant and mycorrhizal fungi. In this paper we also discuss the risk of fungicide resistance, which has been insufficiently explored in the context of forest pathogens.

Keywords: forest protection, forest nurseries, fungicide resistance, fungicides' mode of action

1. Wstęp

Integrowana ochrona szkółek leśnych została uprawniona dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE (art. 14), rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 i rozporządzeniem Komisji (UE) nr 546/2011, dotyczącymi integrowanej ochrony roślin przed szkodnikami, a także ustawą z dnia 8 marca 2013 r. o środkach ochrony roślin (Dz.U. 2013, poz. 455) oraz rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 kwietnia 2013 r. w sprawie wymagań integrowanej ochrony roślin (Dz.U. 2013, poz. 505).

Integrowana ochrona roślin polega na komplementarnym stosowaniu wielu (lub wszystkich) możliwych metod ochrony roślin, a zwłaszcza metod niechemicznych, w sposób minimalizujący zagrożenie dla zdrowia ludzi, zwierząt oraz dla środowiska. W związku z powyższym, w Ministerstwie Rolnictwa i Rozwoju Wsi opracowano projekt krajowego planu działania na lata 2013–2017 na rzecz ograniczenia ryzyka związanego ze stosowaniem środków ochrony roślin. Niestety, ze względu na wysokie koszty procesów oceny wpływu poszczególnych substancji aktywnych na środowisko (sięgających kilku milionów euro) część producentów zrezygnowała z podjęcia wysiłku rejestracji środków ochrony roślin.

W efekcie liczba preparatów dostępnych na rynku znacząco zmniejszyła się, co spowodowało że obecnie leśnictwo ma do dyspozycji znacznie mniej środków ochrony roślin niż wcześniej. Jak zatem postępować w sytuacji ograniczonego wyboru fungicydów? Niniejszy artykuł przeglądowy zestawia preparaty dopuszczone obecnie do stosowania w leśnictwie, pokazuje mechanizmy ich działania oraz obecną i potencjalną skuteczność wobec różnych grup patogenicznych organizmów, wraz z jednoczesną analizą możliwości występowania odporności grzybów na fungicydy (organizmy występujące w Polsce oraz blisko z nimi spokrewnione).

2. Aktualny stan ochrony chemicznej przed chorobami w leśnictwie

Specyfika hodowli szkółkarstwa leśnego sprawia, że ryzyko występowania groźnych dla sadzonek patogenów grzybowych jest bardzo wysokie, jednocześnie ze względu na znikomy wachlarz uprawianych gatunków roślin może dochodzić do nagromadzenia się w glebach czynników chorobotwórczych, natomiast ze względu na ograniczony wybór środków ochrony roślin rekomendowanych do stosowania w szkółkach leśnych zabiegi fungicydowe okazują się często nieskuteczne.

Wpłynęło: 5.12.2013 r., zrecenzowano: 27.03.2014 r., zaakceptowano: 31.07.2014 r.

Obecnie w szkółkarstwie leśnym stosuje się nieliczne substancje aktywne o charakterze grzybobójczym (tab. 1), co stanowi ogromne wyzwanie zarówno dla praktyków, jak i badaczy, których zadaniem jest optymalizacja ochrony roślin. Sytuacja ta związana jest bezpośrednio z polityką firm chemicznych, dla których wysokie koszty rejestracji preparatów fungicydowych, które potencjalnie mogą być stosowane jedynie w uprawach o niewielkim areale (a do takich należy produkcja szkółkarska), stanowią barierę blokującą wprowadzanie nowoczesnych preparatów fungicydowych. Z tego względu w produkcji szkółkarskiej stosuje się najczęściej zabiegi fungicydowe z wykorzystaniem zaledwie kilku substancji aktywnych, będących w użyciu od wielu lat. Ponadto powtarzanie zabiegów na tych samych kwaterach szkółek leśnych z wykorzystaniem substancji czynnych z tej samej grupy lub o identycznym mechanizmie oddziaływania na komórki grzybów selekcjonuje rasy patogenów odporne na działanie preparatów. W tej sytuacji organizmy patogeniczne dla roślin mogą unieвозмоwić intensyfikację produkcji szkółkarskiej w leśnictwie.

Do najważniejszych patogenów występujących w glebach, stanowiących duże zagrożenie dla sadzonek drzew leśnych, należą przede wszystkim grzyby z rodzajów: *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium* i *Cylindrocarpon*. Ograniczenie ich rozwoju jest niezwykle trudne ze względu na ich duże zdolności adaptacyjne, obecność różnych form infekcyjnych i przetrwalnikowych oraz szerokie spektrum roślin żywicielskich. Nagromadzenie patogenów w glebie, w sprzyjających warunkach pogodowych, skutkuje masowym zamieraniem sadzonek. W szkółkach oraz uprawach leśnych niekorzystne jest występowanie mączniaka prawdziwego, osutki sosny oraz opadziny modrzewia, które mogą powodować zamieranie młodych sadzonek lub obniżyć wartość materiału sadzeniowego. Dobór substancji aktywnych zwalczających wymienione grzyby jest ograniczony.

3. Ditiokarbaminiany

W szkółkarstwie leśnym stosuje się przede wszystkim preparaty zawierające ditiokarbaminiany (tab. 1), oddziałujące na komórki grzyba poprzez zakłócenie różnych procesów metabolicznych, których efektem jest zahamowanie kiełkowania zarodników (Wong, Wilcox 2001).

Mankozeb, należący do ditiokarbaminianów, sam w sobie nie wykazuje działania grzybobójczego, ale może być skuteczny jako pre-fungicyd, gdyż w kontakcie z wodą rozkłada się, uwalniając siarczek bis-izotiocyanianu etylenu (EBIS). Związek ten jest następnie pod wpływem promieniowania UV przekształcany do bis-izotiocyanianu etylenu (EBI). Oba te związki wchodzi w reakcję z grupami sulfhydrylowymi enzymów, co zaburza podstawowe procesy enzymatyczne i prowadzi do śmierci komórek. Przypuszcza się również, że związki te wpływają na sześć różnych procesów biochemicznych zachodzących w cytoplazmie i mitochondriach komórek grzybów (Gulliano et al. 2010).

Mechanizm działania ditiokarbaminianów jest wielopunktowy, co sprawia, że jest on niezwykle korzystny z punktu

widzenia praktyki, ponieważ znacznie redukuje możliwość wystąpienia u grzybów odporności trwałej warunkowanej mutacją pojedynczych genów. W takim wypadku u grzybów może jedynie występować tzw. odporność poligenowa, wywołana mutacjami w kilku genach, która może uruchomić mechanizmy detoksyfikacji substancji aktywnej (Gulliano et al. 2010).

Preparaty należące do tej grupy uzyskały na świecie sukces komercyjny, ze względu na szeroki zakres skuteczności w zwalczaniu wielu grup patogenów (*Ascomycetes*, *Basidiomycetes* oraz *Oomycetes*). Efekt ochronny tej grupy preparatów nie jest jednak doskonały, ponieważ są to substancje kontaktowe, a ich działanie jest doraźne. Ich skuteczność jest jednak wystarczająco wysoka w przypadku, gdy są stosowane zapobiegawczo.

4. Amidy kwasu karboksylowego (CAA)

Preparaty należące do grupy CAA (amidy kwasu karboksylowego), do których zalicza się dimetomorf, zostały wprowadzone do użycia na początku lat osiemdziesiątych XX w. Środki te są skuteczne w zwalczaniu *Oomycetes* z rodzin *Peronosporaceae* (takich jak *Plasmopara viticola* i *Bremia lactucea*) oraz *Pythiaceae* (rodzaj *Phytophthora*, lecz nie *Pythium*) (Gisi et al. 2007). Ich działanie polega na zakłóceniu biosyntezy fosfolipidów w komórkach grzyba, co wpływa niekorzystnie na proces tworzenia błony komórkowej. Preparaty te hamują także wszystkie procesy związane z rozmnażaniem grzybów, lecz nie wpływają na rozwój i mobilność zoospor (Wang et al. 2009).

Young i in. (2001), badając aktywność dimetomorfu w warunkach laboratoryjnych, stwierdzili umiarkowaną odporność szczepów *Phytophthora capsici*. W Rosji odporne szczepy *Phytophthora infestans* (gatunku pokrewnego dla najważniejszych patogenów zgorzelowych występujących w Polsce) powstały wskutek częstego powtarzania zabiegów z wykorzystaniem dimetomorfu jako substancji aktywnej (Derevågina et al. 1999). Na stronie internetowej (www.frac.info) organizacji FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) zraszającej badaczy zajmujących się zjawiskiem odporności grzybów na fungicydy z całego świata podano informację, że szczepy *P. infestans* są wrażliwe na preparaty CAA, co jest bardzo istotne dla leśników i szkółkarzy (Moore et al. 2008).

Całkowicie odporny na wszystkie substancje aktywne z grupy CAA okazał się jednak inny gatunek grzyba – *Plasmopara viticola* (Moore et al. 2008). Odporność na CAA zidentyfikowana w warunkach laboratoryjnych u *P. viticola* jest dziedziczona recesywnie (Blum et al. 2010), a w przypadku *Phytophthora capsici* warunkowana przez dwa geny dominujące (Meng et al. 2011).

Najnowsze badania przeprowadzone przez Chen i in. (2012) pozwoliły na zidentyfikowanie w genomie *Phytophthora melonis* mutacji w genie *CesA3* kodującego polipeptyd zbudowany z 1139 aminokwasów o masie molekularnej 126,5 kDa, związanej z odpornością na preparaty CAA. Porównanie sekwencji aminokwasowych izolatów wrażliwych i odpornych

na CCA udowodniło powstanie w kodonie 1109 mutacji polegającej na zamianie aminokwasów: waliny na leucynę (Chen et al. 2012). Zdaniem autorów odporność izolatów *P. melonis* na CAA może być kontrolowana przez gen(-y) recesywny(-e), jednak potwierdzenie tej tezy wymaga dalszych eksperymentów genetycznych (Chen et al. 2012).

Podsumowując, ryzyko wystąpienia powszechnej, tzn. na dużą skalę, odporności lęgniowców *Oomycetes* na substancje aktywne z grupy CAA należy uznać za niewielkie. Można je ponadto zmniejszyć poprzez zaprzestanie powtarzania zabiegów ochronnych w niewielkich odstępach czasu.

5. Karbaminiany

Karbaminiany są przeznaczone do zwalczania *Pythium*, *Phytophthora*, *Aphanomyces* oraz niektórych grzybów z rodzaju *Fusarium*, czyli patogenów powodujących choroby zgorzelowe wielu gatunków roślin (Englander et al. 1980; Rapp, Richter 1983; Cohen, Coffey 1986).

Mechanizm działania propamokarbu (tab. 1), substancji aktywnej z tej grupy, polega na zakłóceniu przepuszczalności błon komórkowych grzybni, jednak w odniesieniu do starszej grzybni czy kielkujących zarodników sporangialnych jego działanie jest mało skuteczne (Papavizas et al. 1978). W związku z tym działanie propamokarbu na roślinach silnie porażonych przez *Phytophthora infestans* zanika (Samoucha, Cohen 1990). Wyniki badań Hu i Hong (2007) wskazują, że w produkcji szkółkarskiej preparat należy stosować prewencyjnie, przed zakażeniem siewek zarodnikami pływkowymi (zoosporami). Propamokarb może spowalniać proces chorobowy poprzez inhibicję produkcji zarodni (sporangiów) oraz ograniczenie aktywności zoospor. Natomiast po wystąpieniu infekcji preparat nie jest skuteczny, dlatego wykonywanie zabiegów w takim przypadku jest niewskazane, tym bardziej, że jednocześnie wzrasta ryzyko uzyskania przez gatunek *Phytophthora* odporności. Prokamokarb nie wykazuje szkodliwego działania na mikroorganizmy korzystne dla roślin takie jak *Trichoderma* i grzyby mykoryzowe (Wilde 1990; May, Kimati 2000). Z tego właśnie powodu preparat powinien być wykorzystywany w programach integrowanej ochrony przed chorobami zgorzelowymi w szkółkarstwie leśnym.

6. Fosfoniany

Systemiczne preparaty z grupy fosfonianów (fosetyl glinu i potasu, sole kwasu fosforowego) (tab. 1) należą do najważniejszych środków przeznaczonych do ograniczania chorób powodowanych przez organizmy grzybopodobne *Oomycetes*, szczególnie z rodzaju *Phytophthora*. Fosfoniany są stosowane szeroko zarówno w ekosystemach zniekształconych gospodarką rolniczą, ogrodniczą i leśną, jak również w środowisku naturalnym (Guest, Grant, 1991; Daniel et al. 2005). Stosuje się je w Afryce, Azji, Australii, Europie i Ameryce Północnej w celu ochrony rzadkich i zagrożonych gatunków roślin oraz w ochronie roślin uprawnych. W ochronie drzew związki te są stosowane w postaci oprysku roztworu wodnego (ze środ-

kiem zwilżającym) lub wstrzykiwane bezpośrednio do pni, gdzie przemieszczają się w tkankach roślinnych za pośrednictwem szlaku fosforanowego (Guest, Grant 1991). Fosfoniany nie są metabolizowane przez roślinę, co powoduje że utrzymują się w tkankach przez znaczny czas (6–8 lat), który ściśle zależy od gatunku rośliny, tempa jej wzrostu oraz intensywności wymiany listowia (Hardy et al. 2001). Mechanizm oddziaływania tych związków na patogen zależy od dawki substancji aktywnej (Smillie et al. 1989): w wysokim stężeniu ograniczają wzrost i zarodnikowanie patogenów (Wilkinson et al. 2001; Garbelotto et al. 2009), natomiast w niskim mogą działać pośrednio, poprzez stymulowanie reakcji obronnych roślin. Stężenie fosfonianów w tkankach roślinnych rzadko osiąga poziom, przy którym, w warunkach *in vitro*, związki te działałyby fungistatycznie, toteż większe znaczenie wydaje się mieć stymulacja mechanizmów obronnych.

Od dawna obserwowano, że działanie fosfonianów może być inne w stosunku do różnych roślin gospodarzy. Jedną z hipotez głosi, że związki te pobudzają przede wszystkim mechanizmy obronne organizmu (Grant et al. 1990; Daniel, Guest 2005). Fosetyl-Al opisywany jest w literaturze jako elicytor mechanizmu obronnego roślin, a jego działanie powoduje wzmoczoną syntezę związków fenolowych w liściach. Dercks i Creasy (1989) podają, że w prowadzonych przez nich badaniach aktywność związku w zwalczaniu *P. viticola* była wysoka zarówno w fazie przedinfekcyjnej, jak również po infekcji. Porównanie aktywności fosetylu-Al w zwalczaniu mączniaka rzekomego winorośli na odmianach zróżnicowanych pod względem odporności wykazało, że reakcja obronna roślin była bezpośrednio związana ze zdolnością syntetyzowania fitoaleksyn przez roślinę. Ponadto najbardziej odporna odmiana winorośli silniej akumulowała w tkankach resweratrol, co wywierało bardzo silną presję na grzyba. Badania Dercksa i Creasy'ego (1989) wykazały także bardzo silną korelację odporności roślin z poziomem akumulacji resweratrolu.

Istnieją także dowody na to, że mechanizm obronny roślin może być stymulowany poprzez zmiany w metabolizmie patogenu. Badania Grant i in. (1990) wykazały, że fosfoniany o niskim stężeniu mogą modyfikować metabolizm gatunków *Phytophthora* bez widocznego wpływu na wzrost grzybni. Guest i Grant (1991) wysunęli hipotezę, że preparaty fosfonianowe mogą oddziaływać na patogen poprzez zakłócenie syntezy jego supresorów, czyli związków „oszukujących” system obronny roślin.

Bardzo interesujące z punktu widzenia praktyki były badania przeprowadzone przez Pilbeam i in. (2011), które potwierdziły, że skuteczność fosfonianów zależy od odporności eukaliptusa na infekcję wywołaną przez *Phytophthora cinnamomi*. Fosfoniany powodowały zróżnicowaną odpowiedź histopatologiczną w tkankach roślin eukaliptusa. W liniach odpornych następowała stymulacja mitozy, powstawanie tkanki przyrannej (kalusa) i synteza ligniny, z kolei w liniach wrażliwych zwiększeniu ulegała produkcja ligniny i suberyny (Pilbeam et al. 2011).

Ryzyko wystąpienia odporności patogennych lęgniowców *Oomycetes* na preparaty fosfonianowe, ze względu na bardzo złożony niespecyficzny mechanizm oddziaływania ochron-

nego, jest niewielkie, jednak istnieją doniesienia o zmniejszonej wrażliwości izolatów *P. cinnamomi* (Dobrowolski et al. 2008) i *Bremia lactucae* (Brown et al. 2004).

7. Morfoliny

Spiroksamina (tab. 1) należy do preparatów morfolinowych – ważnej grupy fungicydów ukierunkowanych na zwalczanie mączniaka prawdziwego, rdzy i parcha (Pommer 1995). Ma ona identyczny sposób oddziaływania na komórki grzyba jak inne substancje aktywne z tej grupy (fenpropimorf, fenpropidyna, tridemorf), miejscowo hamujące biosyntezę steroli (SBI klasy II) (Leroux et al. 1999). Sterole są podstawowym składnikiem wszystkich błon komórkowych organizmów eukariotycznych, a ich występowanie jest niezbędne dla prawidłowego rozwoju (Joffrion, Cushion 2010). Sterole w komórkach grzybów pełnią kilka funkcji: odpowiadają za płynność i przepuszczalność błon komórkowych (Bard et al. 1978; Lees et al. 1979) oraz regulują poziom enzymów z nimi związanych (Cobon, Haslam 1973). Morfoliny wpływają – w różnym stopniu – na dwa specyficzne punkty w szlaku biosyntezy steroli: 1 – hamując przemianę dimetyloergostatrienu do dimetyloergostadienu przez blokowanie Δ^{14} -reduktazy oraz fekosterolu do episterolu, oraz 2 – zakłócając działanie $\Delta^{8,7}$ -izomeryazy (Kerkenaar 1995).

Użycie spiroksaminy jest rekomendowane przede wszystkim w zwalczaniu mączniaka prawdziwego różnych gatunków roślin, a próby jej wykorzystania w zwalczaniu innych grzybów patogenicznych wykazały niską skuteczność substancji aktywnej (Debieu et al. 2000).

W literaturze można odnaleźć doniesienia o spadku wrażliwości populacji patogenicznych grzybów na fungicydy morfolinowe: *Erysiphe graminis* (Felsenstein et al. 1994; Napier et al. 2000), *Microdochium nivale* (Debieu et al. 2000), *Botrytis cinerea* (Leroux et al. 1999), *Nectria haematococca* (Lasseronde Felandre et al. 1999). Dodatkowo, ze względu na możliwość uzyskania przez organizmy zwalczane odporności krzyżowej, organizacja Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) w 2005 roku oceniła ryzyko wystąpienia odporności na spiroksaminę od niskie do średniego (www.frac.info). Odporności na preparaty z grupy SBI dotyczyły badania Zhu i in. (2008), które potwierdziły występowanie odporności krzyżowej *Pseudoperonospora cubensis* (*Oomycetes*) na SBI. W szczepach odpornych mutantów stwierdzono odporność zarówno na flumorf, jak i dimetomorf (różne rodzaje fungicydów), a wyniki badań jednoznacznie wskazują, że jest to ten sam mechanizm odporności, wobec powyższego ryzyko występowania odporności w tym wypadku należy uznać za średnie (Zhu et al. 2008).

Zastosowanie preparatów SBI w szkółkarstwie może nieść za sobą pewne zagrożenia. W szkółkach kontenerowych, gdzie poważnym problemem jest występowanie mączniaka prawdziwego, substancje morfolinowe mogą przenikać do bryłki substratu, przez co może dojść do spadku skuteczności stosowania szczepionek mykoryzowych. Morfoliny zastosowane w warunkach laboratoryjnych już w niskich dawkach wpływały niekorzystnie na wzrost strzępek i zarodnikowanie ar-

buskularnego gatunku *Glomus intraradices*, co było związane z zaburzeniami metabolizmu steroli (Campagnac et al. 2009).

Poprzednie badania przeprowadzone przez zespół pod kierunkiem Campagnaca (Campagnac et al. 2008), dotyczące preparatów morfolinowych (fenpropimorfu i fenheksamidu), wykazały także bezpośredni wpływ wymienionych substancji aktywnych na stopień mykoryzacji korzeni przez *Glomus intraradices*. Pierwszy z wymienionych preparatów – penpropimorf, redukował ten proces w sposób drastyczny (Campagnac et al. 2008). Cardenas-Flores i in. (2011) stwierdzili z kolei, że zastosowanie fenheksamidu wpływało niekorzystnie także na inny gatunek mykoryzowy *Glomus larum*. Według nich wysokie stężenie oraz częste powtarzanie zabiegów z wykorzystaniem substancji aktywnych z grupy SBI ma niekorzystny wpływ na grzyby mykoryzowe w glebie.

Negatywnego wpływu spiroksaminy na rozwój symbiozy ektomykoryzowej nie potwierdzają wyniki badań Kuca i Aleksandrowicz-Trzecińskiej (2012). Autorzy ci podają, że preparat Falcon 460 EC nie ograniczał mykoryzy sadzonek dębu z grzybem *Hebeloma crustuliniforme*, a wręcz przeciwnie, mógł stymulować mykoryzy powstające spontanicznie.

8. Preparaty DMI (triazole)

Fungicydy należące do tej grupy obejmują około 30 substancji aktywnych, o wysokiej efektywności wobec wielu patogenów grzybowych. Preparaty DMI mają zastosowanie w ograniczaniu występowania mączniaka prawdziwego różnych roślin oraz grzybów rdzawnikowych i głowniowych, zgnilizny twardzikowej, szarej pleśni, a także innych patogenów grzybowych wywołujących plamistość liści.

Badania Edgingtona (1981) dowiodły, że fungicydy triazolowe przenikają przez korzenie, pędy i liście, absorbowane są w ksylemie i przemieszczane akropetalnie w roślinach, a nie są przenoszone floemem do korzeni.

Związki te blokują biosyntezę steroli w komórkach grzybów (Yang et al. 2011). Mechanizm ten opiera się na hamowaniu 14- α demetylasy sterolowej zależnej od cytochromu P-450 w pozycji 14 lanosterolu oraz w mniejszym stopniu na inhibicji Δ^{24} -metylotransferazy sterolowej (Elliott 1999). Większość preparatów DMI hamuje działanie cytochromu poprzez przyłączenie do kieszeni cysteinowej w miejscu aktywnym enzymu. Jak wskazują dane literaturowe, odporność połową na preparaty triazolowe stwierdzono już po około 10 latach stosowania, w populacjach mączniaka prawdziwego i parcha (McGrath 2001; Ma, Michailides 2005). Dalsze badania dotyczące odporności grzybów na te fungicydy pozwoliły na zidentyfikowanie form o zmniejszonej wrażliwości w populacjach: *Fusarium asiaticum* (Yin et al. 2009), *F. graminearum* (Yin et al. 2009), *F. solani* (Kalamarakis et al. 1991), *Microdochium nivale* (Cristani, Gambogi 1993). W związku z bardzo specyficznym oddziaływaniem na patogen oraz dużą różnorodnością preparatów o podobnym mechanizmie działania, ryzyko uzyskania odporności na preparaty oceniane jest jako średnie z dużym prawdopodobieństwem występowania odporności krzyżowej (www.frac.info).

Literatura podaje, że mechanizmy odporności na DMI zaobserwowane w populacjach grzybów obejmują: mutację genu- 14 α -demetylazy (*CYP51*), która prowadzi do zmniejszenia powinowactwa DMI z docelowym białkiem (Delye et al. 1997), nadekspresję lub zwiększenie liczby kopii genu *CYP51*, co skutkuje zwiększeniem ilości docelowego enzymu (Hamaoto et al. 2000), nadekspresję białek transportowych kasety wiążącej ATP (ABC) (efflux pumps) zaangażowanych w transport cukrów, aminokwasów, białek, peptydów oraz jonów metali (Zwiers et al. 2002), oraz niezidentyfikowane mechanizmy odporności na DMI (Mellado et al. 2001; Wood et al. 2001).

Preparaty DMI poza właściwościami fungistatycznymi wykazują pośrednie działanie na komórki bakteryjne, pomimo że nie zawierają one steroli. W pracach badawczych wykazano, że tritikonazol stymuluje proliferację bakterii w glebie, zaś fenpropimorf i propikonazol całkowicie hamują aktywność glebowych bakterii (Milenkovski et al. 2010).

Związki triazolowe, ze względu na mechanizm modyfikujący szlak sterolu różnych organizmów, wykazują także zbliżone do regulatorów wzrostu oddziaływanie na rośliny (Coolbaugh et al. 1982; Barnes et Kelley 1992). Niektóre preparaty triazolowe wykorzystuje się jako retardanty wzrostu roślin (inhibitory wzrostu) (Rademacher 2000). Działanie DMI w tym zakresie polega na hamowaniu biosyntezy gibbereliny, co prowadzi do ograniczenia wzrostu wydłużeniowego korzeni i pędów (Görtz et al. 2008).

Okazuje się, że mimo szerokiej aktywności preparatów DMI, wpływających zarówno na grzyby, bakterie i rośliny, związki triazolowe nie wykazują oddziaływania fungistatycznego na lęgniowce. Odpowiedzialny za to jest duży dystans filogenetyczny dzielący grzyby właściwe i lęgniowce, co przekłada się bezpośrednio na różną efektywność środków ochrony roślin w ograniczaniu występowania tych odrębnych grup organizmów. Komórki *Phytophthora* oraz inne gatunki należące do *Oomycetes* nie zawierają ergosterolu, a w ich genomach nie występują funkcjonalne geny *CYP51* (Tyler et al. 2006). Organizmy te mają jednak zdolność do produkcji skwalenu i transformacji egzogennych steroli, dlatego można je zaliczyć do organizmów aukstroficznych w kierunku pozyskiwania steroli (Marshall et al. 2001).

Preparaty triazolowe w szkółkarstwie i uprawach leśnych stosuje się interwencyjnie w zwalczaniu mączniaka prawdziwego dębu (*Erysiphe alphitoides*), osutki sosny (*Lophodermium pinastri*, *L. seditosum*) i opadziyny modrzewia (*Meria laricis*) (tab. 1).

Znane są także przykłady stosowania preparatów DMI w starszych drzewostanach. W USA propikonazol stosowany jest w leczeniu zamierania dębów (*Chalara quercina*). Skuteczność wymienionej substancji aktywnej w zwalczaniu tej groźnej choroby dębów została udokumentowana w pracach badawczych Eggers i in. (2005) oraz Peacock i Fulbright (2007). Przeprowadzenie zabiegu leczniczego polega na wprowadzeniu fungicydu za pomocą makro- lub mikroiniekcji do części drewna, uczestniczącej w transporcie wody (Wilson, Lester 2002). Wykonanie mikroiniekcji polega na wprowadzeniu małej objętości stężonej substancji aktywnej za pomocą mikroiniektorów przez otwór wywiercony w drewnie. Liczba miejsc

mikroiniekcji uzależniona jest od średnicy drzewa, a rozmieszczenie ich jest równomierne. Mechanizm pobierania fungicydu przez tkanki drzewa jest głównie pasywny, może także zostać wymuszony za pomocą iniektorów (Haugen, Stennes 1999). W zabiegu makroiniekcji wprowadza się stężone substancje aktywne (4–8 ml) o większej objętości wody. Badania przeprowadzone przez Haugen i Stennesa (1999) wykazały, że duże objętości rozcieńczonych fungicydów są lepiej rozprowadzane w tkankach drzew i dzięki temu skuteczniejsze. Efekt ochronny propikonazolu w zamieraniu dębów utrzymuje się przez dwa lata od zastosowania preparatu (Eggers et al. 2005), lecz jego aplikacja nie jest skuteczna w przypadku porażonych korzeni (Wilson, Lester 2002).

9. Aminopirymidyny

Aminopirymidyny to grupa systemicznych substancji aktywnych skutecznych wobec mączniaka prawdziwego (*Erysiphales*), rzadziej stosowanych w zwalczaniu rdzy i głowni. Do tej grupy fungicydów należy bupirymat, którego mechanizm działania polega na hamowaniu syntezy kwasów nukleinowych (Hollomon 1979) poprzez ograniczenie aktywności deaminazy adenozy (ADA), enzymu uczestniczącego w metabolizmie puryn, który katalizuje reakcję deaminacji adenozy do inozy (Hollomon, Chamberlain 1981). Dowiedziono, że preparaty aminopirymidynowe powinny być stosowane we wczesnych fazach infekcji, ponieważ hamują formowanie apesoriów i haustoriów mączniaka prawdziwego. Wykorzystanie tej grupy substancji aktywnych może być także korzystne w późniejszych fazach rozwoju, ponieważ hamują one kiełkowanie zarodników (Hollomon, Schmidt 1987).

Pierwsze preparaty aminopirymidynowe, wprowadzone około 1968 roku, wykazywały początkowo bardzo skuteczne działanie w ograniczaniu mączniaka prawdziwego ogórka (*Sphaerotheca fuliginea*). Jednak po około dwóch latach, ze względu na częste powtarzanie zabiegów ochronnych, w populacjach *S. fuliginea* zaobserwowano odporność na te substancje aktywne (Brent 1982).

Występowanie form odpornych na aminopirymidyny potwierdzono także w populacjach mączniaka prawdziwego jęczmienia *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* (Hollomon 1979). Jak dotąd mechanizm odporności grzybów na tę grupę substancji aktywnych pozostał niewyjaśniony. Brent i Hollomon (2007) podają, że reakcja odpornościowa mączniaka na aminopirymidyny nie jest gwałtowna, lecz należy ją określić jako ciągłą i progresywną. Zdaniem autorów populacja patogenu może powrócić do stanu wrażliwości na preparat, jeśli zabiegi ochronne będą wykonywane mniej intensywnie z jednoczesnym wykorzystaniem innych substancji aktywnych (Brent, Hollomon 2007).

Podsumowując, należy zwrócić uwagę, iż rekomendowane do zwalczania mączniaka i osutki sosny triazolowe i aminopirymidynowe substancje aktywne, mające służyć do ograniczania występowania tych jednostek chorobowych, mają niezwykle wąski zakres działania na grzyby. Oczywiście

intensyfikacja zabiegów ochronnych, w sytuacji gdy brakuje innych zalecanych substancji aktywnych, może skutkować występowaniem zjawiska odporności na większą skalę. Dodatkowo, ograniczenie występowania mączniaka prawdziwego jest niezwykle trudne, co wynika z ogromnego potencjału rozmnożeniowego (intensywne zarodnikowanie), krótkiego cyklu życiowego oraz szerokiego zakresu preferencji temperaturowych i wilgotnościowych tej grupy organizmów. Zahamowanie występowania objawów chorobowych osiąga się przez częste powtarzanie zabiegów ochronnych, zaś ograniczony dostęp do substancji aktywnych powoduje, iż koniecznością staje się poszukiwanie alternatywnych metod zwalczania tych patogenów (Pap et al. 2012).

10. Preparaty nieorganiczne (tlenochlorek miedziowy)

Związki nieorganiczne są najstarszą grupą substancji aktywnych stosowanych w zwalczaniu chorób roślin. Pierwsze doniesienia dotyczące zastosowania miedzi organicznej sięgają 1761 roku, kiedy siarczan miedzi (CuSO_4) wykorzystano w bardzo dużej koncentracji do ochrony pszenicy przed głownią. Prace nad zastosowaniem miedzi w zwalczaniu chorób roślin kontynuował Prevost (1807), który odnotował hamowanie kiełkowania zarodników głowni. Dalsze badania dotyczące wykorzystania miedzi prowadził botanik, profesor Millardet z Bordox, który około roku 1885 zastosował „ciecz bordoską” ($3\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuSO}_4 \cdot \text{CaSO}_4$) do ochrony winorośli przed mączniakiem rzekomy (*Plasmopara viticola*). W kolejnych latach preparaty miedziowe stosowano także w zwalczaniu zarazy ziemniaka. Największy postęp w badaniach nad preparatami miedziowymi przypadł na lata 1925–35, kiedy opatentowano pierwsze substancje aktywne z tej grupy.

Obecnie w ochronie roślin jony miedzi (Cu^{2+}) stosuje się w postaci siarczanu miedzi, tlenku miedzi, naftenianu miedzi, tlenonochloru miedzi, 8-hydroksykwiniolinianu miedzi. Preparatów miedziowych używa się do zwalczania: mączniaków rzekomych, zarazy ziemniaka oraz innych grzybów powodujących plamistość liści, a w leśnictwie do ograniczania występowania osutki modrzewia (tab. 1).

Mechanizm oddziaływania miedzi na komórki grzybów jest złożony. Jony miedzi wykazują powinowactwo z różnymi grupami chemicznymi występującymi w komórkach grzybów i reagują z grupami tiolowymi, powodując niespecyficzną denaturację białek i enzymów. Tworzą trwałe kompleksy z koenzymami i innymi związkami biologicznie czynnymi, co prowadzi do ograniczenia aktywności metabolicznej grzybów. Preparaty miedziowe ograniczają procesy oddechowe w komórkach grzybów, poprzez inhibicję powstawania acetylo-CoA, przerywają proces fosforylacji w łańcuchu oddechowym i jednocześnie hamują tworzenie ATP.

Wpływ preparatów miedziowych nie ogranicza się do grzybów patogennych. Badania z wykorzystaniem tlenochloru miedzi, przeprowadzone na czystych kulturach, wykazały ich negatywny wpływ na populacje grzybów mykoryzowych *Glomus* spp. i *Arachis hypogea* L. (Sreenivasa,

Bagyaraj 1989) oraz neutralny wpływ na gatunki *Glomus fasciculatum* i *Agrostis palustris* L. (Rhodes, Larser 1981). Uzyskane rozbieżne rezultaty badań wynikały z odmiennego oddziaływania substancji aktywnej na grzyby mykoryzowe w odniesieniu do różnych gatunków roślin (Rhodes, Larser 1981; Sreenivasa, Bagyaraj 1989).

Inne prace badawcze wykazały zmniejszenie aktywności mikroorganizmów glebowych oraz hamujący wpływ preparatów miedziowych na grzyby ektomykoryzowe w środowiskowych próbach na sadzonkach sosny (Manninen et al. 1998). Dalsze badania dotyczące tlenochloru miedzi dowiodły ograniczenia wzrostu kolejnych gatunków grzybów mykoryzowych: *Cantharellus cibarius*, *Corticium bicolor*, *Paxillus involutus* i *Suillus* (Laatikainen, Heinonen-Tanski 2002).

Dane literaturowe wskazują także na możliwość niekorzystnego wpływu preparatów miedziowych na rośliny. Gibson (1958) wykazał, że związki miedzi zastosowane na glebach kwaśnych (tlenochlorek miedzi i tlenek miedzi) działały fitotoksycznie na gatunki sosny *Pinus radiata* i *Pinus patula*. Niekorzystne oddziaływanie polegało na przedwczesnym zamieraniu wierzchołka korzenia i ostatecznie śmierci sadzonki, mechanizm ten jest jednak mało poznany (Orbovic et al. 2007).

W literaturze można odnaleźć także informację, że jony miedzi są skuteczne przeciwko niektórym grzybom powodującym zgniliznę drewna. Z badań wykonanych przez Chen (2010) wynika, że mechanizm ochrony drewna przed grzybami polega na wiązaniu miedzi z polisacharydami i ligninami w ścianach komórkowych drewna. Bardzo korzystna dla tego procesu jest także migracja jonów Cu^{2+} w drewnie (Choi et al. 2001). Preparaty miedziowe wykazują niższą skuteczność przeciwko białej i brunatnej zgniliznie drewna, powodowanej przez grzyby z rodzin *Antrodia* i *Serpula*, które wiążąc jony miedzi tworzą nietoksyczne kryształy szczawianu miedzi (Hastrup et al. 2005). Poprawę skuteczności preparatów miedzi organicznej w ograniczaniu grzybów uszkadzających drewno można uzyskać przez łączne stosowanie z czwartorzędowymi solami amoniowymi QAC – substancje czynne niszczące bakterie, mniej skuteczne przeciwko grzybom, które w połączeniu z jonami miedzi dają efekt synergiczny (Härtner, Barth 1996).

11. Pochodne węglowodorów aromatycznych

Pochodne węglowodorów aromatycznych są grupą fungicydów posiadających pierścień benzenowy w cząsteczce oraz charakteryzujących się różną aktywnością wobec grzybów. Chlorotalonil (TPN, -2, 4, 5, 6- tetrachloroisoftaloni-tryl)- zarejestrowany po raz pierwszy jako fungicyd w 1966 roku, rekomendowany jest do szerokiego stosowania w rolnictwie, ogrodnictwie i leśnictwie na całym świecie (Wang et al. 2011). Preparat ma bardzo szerokie spektrum działania, głównie jako środek grzybobójczy, w szczególności do zwalczania mączniaka prawdziwego. Ma on również właściwości bakteriobójcze, algobójcze i owadobójcze. Dokładny mechanizm jego działania nie jest poznany, jednakże można go scharakteryzować jako inaktywację, związanych z glu-

tationem enzymów zaangażowanych w procesy oddechowe komórek grzybów (Arvanites, Boerth 2001). FRAC – Fungicide Resistance Action Committee (www.frac.info) charakteryzuje preparat jako kontaktowy środek o wielopunktowym mechanizmie oddziaływania na patogen, co powoduje że w odniesieniu do niego istnieje niskie ryzyko powstania odporności w populacjach grzybów. W badaniach wykazano także efekt fitotoksyczny preparatu w stosunku do siewek i sadzonek drzew w szkółkach leśnych (James, Woo 1984). Niekorzystny wpływ preparatu na sadzonki drzew potwierdziła także Laatikainen (2006), wykazując, że zastosowany w szkółkach kontenerowych chlorotalonil redukuje wzrost siewek sosny i opóźniał ich rozwój, a tym samym ich hartowanie. Efekt działania preparatu utrzymywał się długo, po upływie 2 lat widoczne były zmiany zawartości azotu oraz wolnych aminokwasów w sadzonkach sosny (Laatikainen 2006). Wykazano także, że chlorotalonil ma wysoce toksyczny wpływ na populacje grzybów glebowych (Sigler, Turco 2002), a w badaniach prowadzonych na czystych kulturach stwierdzono, że jest on wysoce toksyczny dla grzybów ektomykoryzowych (Laatikainen, Heinonen-Tanski 2002). Powyższego spostrzeżenia nie potwierdziły jednak badania Aleksandrowicz-Trzecińskiej (2008), w których chlorotalonil nie ograniczał rozwoju mykoryz w odnowieniach sosnowych. Preparat TPN jest także wysoce toksyczny dla ryb, ptaków i wodnych bezkręgowców (Caux et al. 1996), jest także szkodliwy dla człowieka (Draper et al. 2003).

12. Pirydynokarboksyamidy (SDHI – inhibitory dehydrogenazy bursztynianowej)

Wprowadzenie do użycia fungicydów SDHI (inhibitory mitochondrialnego kompleksu II: karboksyna i oksykarboksyna) pierwszej generacji datuje się na koniec lat 60. XX wieku. Były to związki hamujące procesy oddechowe, skuteczne w zwalczaniu chorób powodowanych głównie przez *Basidiomycetes* (Zhang et al. 2009). Docelowym miejscem ich działania jest kompleks dehydrogenazy bursztynianowej (SDH) w łańcuchu oddechowym (kompleks II) w miejscu wiązania ubichinonu (SQR), na skutek zakłócenia transportu elektronów zahamowane jest oddychanie mitochondrialne (Yin et al. 2011).

Druga generacja inhibitorów dehydrogenazy bursztynianowej, do których należy zarejestrowany w 2003 roku boskalid, to preparaty o szerokim spektrum aktywności wobec grzybów patogenicznych dla wielu gatunków roślin uprawnych (Avenot, Michailides 2010).

Preparat wiązany jest w warstwie woskowej kutykuli, a także translaminarnie przemieszcza się w tkankach po wewnętrznej stronie liści. Według raportu Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności – EFSA boskalid jest czwartym najczęściej spotykanym w żywności pestycydem (EFSA 2013). Niewątpliwie taka popularność preparatu przekłada się na duże ryzyko występowania genetycznie warunkowanej odporności. Organizacja FRAC ocenia ryzyko występowania odporności na preparaty SDHI na średnie do wysokiego (www.frac.info), dlatego w przypadku roślin do jej badań

podstawowych wprowadzono obowiązek monitoringu odporności grzybów patogenicznych na preparaty SDHI.

Zgodnie z zaleceniami FRAC, ze względu na występowanie odporności krzyżowej w obrębie grupy SDHI, preparaty powinny być stosowane profilaktycznie, gdy ryzyko choroby jest wysokie. Nie powinny być stosowane interwencyjnie, w szczególności gdy populacja patogenu jest liczna (McKay et al. 2011). Preparaty te powinny być używane maksymalnie 2-krotnie w ciągu sezonu wegetacyjnego, najlepiej w połączeniu z inną substancją czynną lub naprzemiennie z substancjami z innych grup, które nie wykazują odporności krzyżowej (McKay et al. 2011). Preparaty SDHI nie wykazują krzyżowej odporności z innymi grupami fungicydów: strobilurynami, benzimidazolami oraz anilinopirymidynami, dlatego w celu wyeliminowania ewentualnych szczepów odpornych powinny być stosowane łącznie z innymi substancjami czynnymi (Stammler et al. 2007).

Najnowsze badania dotyczące działania boskalidu na procesy glebotwórcze wykazały, że jest to związek trwały o małej mobilności, posiadający niekorzystny wpływ na przemiany fosforu i węgla oraz procesy oddechowe w glebach (Xiong et al. 2014).

13. Fungicydy strobilurynowe – QoI

Strobiluryny to jedna z najważniejszych grup fungicydów o szerokim spektrum antygrzybowym, skuteczna wobec Acomycets, Basidiomycets i Oomycets. Po raz pierwszy uzyskano strobilurynę (azoksystrobina) w 1977 roku z grzybni szyszkówki gorzkawej (*Strobilurus tenacellus*), gatunku rozkładającego drewno (Schramm et al. 1978). Dotychczas wyizolowano około 20 analogów strobiluryn z podstawczaków, np. *Oudemansia iellamucida*, *Pterula* sp., *Xerula longipes*, *Mycena crocota*, *Favolaschia calocera* i workowców, np. *Bolinea lutea* (Malita 2008). Fungicydy należące do tej grupy są wysoko cenione za dużą skuteczność, niską toksyczność dla komórek ssaków oraz bezpieczeństwo dla środowiska (Zhang et al. 2012).

Strobiluryny działają hamująco na oddychanie mitochondrialne w komórkach grzybów. Zakłócają one procesy energetyczne, blokując transfer elektronów przez błonę mitochondrialną między cytochromem b i cytochromem c1 w miejscu utleniania chinolu (Qo) i zapobiegając w ten sposób powstawaniu ATP, co przerywa cykl energetyczny patogenu (Ammermann et al. 2000).

Piraklostrobina jest fungicydem z grupy strobiluryn, który oddziałuje hamująco na wzrost strzępek grzybni i zarodnikowanie (Ammermann et al. 2000). W roślinach przemieszcza się ona systemicznie i translaminarnie (przemieszcza się z jednej strony liścia na drugą). Strobiluryny posiadają także działanie regulujące wzrost i rozwój roślin. Wykazano, że piraklostrobina zastosowana na zdrowych roślinach powoduje wzrost ich biomasy na skutek zwiększonego pobierania azotu (Köehle et al. 2003). Wykazano także, że fungicydy QoI hamują oddychanie w roślinach (Glaab, Kaiser 1999), wywołują także inne zmiany fizjologiczne, wpływając na tworzenie się fitohormonów prowadzące do opóźnienia starzenia

się liści (Ruske et al. 2003). Preparaty z tej grupy redukują przewodnictwo szparkowe oraz ograniczają zużycie wody, co prowadzi do wzrostu aktywności fotosyntetycznej roślin (Grossman et al. 1999), a także zwiększa aktywność enzymów antyoksydacyjnych (Wu, Tiedemann 2002).

Wysoce specyficzny mechanizm działania strobiluryn na komórki grzyba oraz częste ich stosownie sprzyja szybkiemu uodpornieniu się patogenów na tę grupę fungicydów. Odporność patogenów notuje się na całym świecie w populacjach patogenów roślin uprawnych, owoców, warzyw, roślin ozdobnych i traw (Fernández-Ortuño et al. 2008), a ryzyko jej występowania oceniane jest na bardzo wysokie. W monografiach FRAC można odnaleźć informację, że w przypadku roślin odporność połową na strobiluryny zidentyfikowano w populacjach przeszło 30 gatunków grzybów patogennych (www.frac.info). Dowiedziano, że za odporność na preparaty QoI odpowiadają punktowe mutacje (polimorfizm pojedynczego nukleotydu) w sekwencji genu cytochromu b, prowadzące do zamiany trzech aminokwasów: zamiana glicyny na alaninę w pozycji 143 (G143A), zamiana fenyloalaniny na leucynę w pozycji 129 (F129L) oraz zamiana glicyny na argininę w pozycji 137 (G137R) (Kim et al. 2003; Sierotzki et al. 2006). Skutkiem tych mutacji jest alternatywne oddychanie oraz wzrost aktywności białek transportowych kasyety wiążącej ATP (ABC), związanych z błoną komórkową, odpowiadających za mechanizm naturalizacji fungicydów (Fernández-Ortuño et al. 2008). W publikacjach FRAC znajdują się informacje wskazujące, jak należy stosować fungicydy QoI, by zminimalizować ryzyko uzyskania odporności przez patogeniczne gatunki grzybów. Ze względu na wysoką efektywność w hamowaniu kiełkowania zarodników preparaty te powinny być stosowane profilaktycznie. Mogą być one używane samodzielnie (w blokach z innymi fungicydami) lub zamiennie z preparatami z innej grupy odporności krzyżowej. Preparaty QoI można stosować także w mieszaninie z innymi substancjami czynnymi, jednakże takimi, które mają inny mechanizm działania na komórki patogenu, co poszerza spektrum zabiegu ochronnego i poprawia jego efektywność. Substancje czynne dołączenia ze strobilurynami należy dobierać w taki sposób, aby ich skuteczność na docelową populację patogenów w samodzielnym stosowaniu była wysoka (www.frac.info).

Obecnie duży wysiłek badaczy skupia się na modyfikacji struktury pochodnych strobiluryny, aby uzyskać nowe związki o antygrzybowych właściwościach, które byłyby skuteczne na populacje patogenów odpornych. Badania wskazują, że skutecznym sposobem pozyskania nowych strobiluryn są modyfikacje łańcucha bocznego (Li et al. 2006).

14. Bezimidazole (MBC)

Benzimidazole to grupa fungicydów systemicznych wprowadzonych do użycia około roku 1968, o wysokiej aktywności wobec patogenów odglebowych i naczyniowych. Jest to grupa preparatów grzybobójczych, pochodnych benzimidazolu, które w swojej strukturze chemicznej zawierają

pierścień benzenowy i pierścień imidazolowy. Ich działanie na komórki grzyba polega na hamowaniu podziałów komórkowych (Yang et al. 2011). Badania wykazały, że fungicydy MBC wiążą β -tubulinę w mikrotubulach i hamują ich proliferację (Koo et al. 2009), przez co zakłócony zostaje zespół mikotubul wrzeciona podziałowego, transport komórkowy oraz formowanie i funkcje cytoszkieletu (Rathinasamy, Panda 2006). Tiofanat metylu należący do grupy fungicydów MBC jest preparatem systemicznym o szerokim spektrum antygrzybowych właściwości. Stosowany jest w ochronie zbóż, w warzywnictwie, sadownictwie i w leśnictwie, a także w ochronie drewna (Cycoń et al. 2011).

Pierwsze sygnały o odporności grzybów na preparaty z grupy MBC notowano w 1973 roku, a obecnie zidentyfikowano ją u wielu gatunków fitopatogenów. W większości przypadków odporność była związana z występowaniem punktowych mutacji w genie β -tubuliny, co prowadziło do zmiany sekwencji aminokwasowej w miejscu wiązania benzimidazolu. Dane literaturowe dowodzą, że odporność wielu patogenicznych dla roślin grzybów na preparaty MBC wynika najczęściej z mutacji w kodonie 6, 50, 167, 198, 200 i 240 β -tubuliny (Ma, Michailides 2005). Odporność na MBC ma cechy odporności krzyżowej na wszystkie preparaty należące do tej grupy (www.frac.info).

Chociaż nie ma dowodów na bezpośredni negatywny wpływ preparatów MBC na populacje bakterii glebowych, to jednak wykazano, że obecność fungicydów MBC w glebie hamuje nityfikację, w której pośredniczą bakterie (Chen et al. 2001). Jednoznacznie wykazano jednak negatywny wpływ na grzyby mykoryzowe, np. w przypadku gatunku arbuskularnego *Glomus mosseae* po zastosowaniu połowej dawki fungicydu z grupy MBC obserwowano zahamowanie wzrostu grzybni oraz tworzenia zarodników (Chiocchio et al. 2000).

15. Podsumowanie

Stosowanie fungicydów jest obecnie najskuteczniejszą metodą ograniczania organizmów patogennych w przypadku roślin. Jednakże szeroko pojęta produkcja leśna, ze względu na ograniczone rozmiary, jest mało atrakcyjnym rynkiem dla producentów fungicydów, co przekłada się na niewielką liczbę preparatów dostępnych w zorganizowanej produkcji leśnej. Niewątpliwie pewnym antidotum na uzdrowienie tej sytuacji jest obowiązek stosowania zasad integrowanej ochrony roślin, które dotyczą wszystkich gałęzi zorganizowanej produkcji roślinnej. Z drugiej strony nowoczesne szkółkarstwo leśne, ze względu na stale rosnącą produkcję, boryka się z występowaniem zwiększającej się liczby jednostek chorobowych, co powoduje straty finansowe. Dlatego niezwykle istotne dla poprawy fitosanitarnej jakości produktów szkółkarskich jest stosowanie alternatywnych metod ochrony roślin oraz lobbowanie u producentów, by nowoczesne fungicydy o szerokim spektrum fungistatycznej aktywności wprowadzane były częściej i szybciej do produkcji szkółkarskiej. Jednocześnie w celu zachowania zasad dobrej praktyki ochrony roślin należy wprowadzić, przy udziale ist-

Tabela 1. Preparaty fungicydowe stosowane w szkółkarstwie leśnym (Głowacka et al. 2013)
Table 1. Fungicides used in forest nurseries (Głowacka et al. 2013)

Lp. No.	Grupa fungicydów Group of fungicides	Substancja czynna Active substance	Preparat Preparation	Rok wprowadzenia substancji aktywnej Introduction date of active substance	Zakres działania Scope of activity	Mechanizm działania Mode of action	Rekomendacja stosowania w szkółkach leśnych Use recommendation in forest nurseries
1	CAA (amidy kwasu karboksylowego) Carboxylic acid amides	dimetomorf dimetomorph	Acrobat MZ 69 WG	około 1980 around 1980	wgłębne deep-seated	inhibicja syntezy celulozy u Oomycetes inhibition of cellulose synthesis in Oomycetes	Stwierdzona odporność na substancję aktywną Confirmed resistance to active substance odporność <i>Phytophthora capsici</i> w warunkach laboratoryjnych (Young et al. 2001); <i>Plasmopara viticola</i> w środowisku resistance of <i>Phytophthora capsici</i> in laboratory conditions (Young et al. 2001); <i>Plasmopara viticola</i> in the environment
2	Ditiokarbami- niany Dithiocarbamates	mankozeb		około 1960 around 1960	kontaktowe contact		
		mankozeb	Penncozeb 80 WP	około 1960 around 1960	kontaktowe contact	zgorzele siewek / fytoftoroza / osutki sosny seedling blight / phytophthora disease / shed of pine needles	niskie ryzyko ze względu na wielopunktowy mechanizm działania, <i>Botrytis cinerea</i> – odporność w warunkach laboratoryjnych (Barak et Edgington 1984) low risk due to multi-point mechanism of action, <i>Botrytis cinerea</i> – resistance under laboratory conditions (Barak et Edgington 1984)
		tiuram thiram	Zaprawa nasienna T 75 DS/WS	około 1960 around 1960	kontaktowe contact	zaburzenia procesów metabolicznych, hamowanie kiełkowania zarodników disturbance of metabolic processes, inhibition of spore germination	zgorzele siewek seedling blight
		tiuram thiram	Thiram Granuflo 80 WG	około 1960 around 1960	kontaktowe contact		zgorzele siewek, szara pleśń seedling blight, grey mould
3	Karbamiiany Carbamates	metiram methiram	Polyram 70 WG	około 1960 around 1960	kontaktowe contact		
		propamo- karb promaocarb	Previcur Energy 840 SL	1978	systemiczne systemic	zakłócenie przepuszczalności błon komórkowych disturbance of permeability of cell membranes	<i>Pythium</i> spp. w środowisku (Moorman et al. 2002 2004); <i>Pythium</i> spp. in the environment (Moorman et al. 2002 2004);
4	Fosfoniany Phosphonics	fosetyl glinowy fosetyl aluminum		1977	systemiczne systemic	fungistyczne bezpośrednie – wysokie dawki, pośrednie elicytory lub supresory direct fungistatic-high doses, indirect elicitors or suppressors	<i>Phytophthora citrophthora</i> w warunkach laboratoryjnych (Angeles Diaz Borrás et Vila Aguilar 1988) <i>Phytophthora citrophthora</i> under laboratory conditions (Angeles Diaz Borrás et Vila Aguilar 1988)

Lp. No.	Grupa fungicydów Group of fungicides	Substancja czynna Active substance	Preparat Preparation	Rok wprowadzenia substancji aktywnej Introduction date of active substance	Zakres działania Scope of activity	Mechanizm działania Mode of action	Rekomendacja stosowania w szkółkach leśnych Use recommendation in forest nurseries
5	Ketaminy (morfoliny) Ketamines (morpholines)	spiroksamina spiroxamine	Falcon 460 EC/ Sokół 460 EC	1999	systemiczne systemic	inhibitory biosyntezy steroli klasy II (SBI) sterol biosynthesis inhibitors of class II	<i>Erysiphe graminis tritici</i> (Napier et al. 2000); <i>Nectria haematococca</i> – w warunkach laboratoryjnych (Lasseron-De Felandre et al. 1999) <i>Erysiphe graminis tritici</i> (Napier et al. 2000); <i>Nectria haematococca</i> under laboratory conditions (Lasseron-De Felandre et al. 1999)
6	DMI (triazole)	tebukonazol tebukonazole	_____	1986	systemiczne systemic	inhibitory dimetylacji steroli klasy I inhibitors of sterol dimethylation of class I	mączniak prawdziwy dębu / osutka sosny oak powdery mildew / pine needlecast
7	Pyrimidyny Pyrimidine	bupirymat bupirimate	Nimrod 250 EC	1976	systemiczne systemic	inhibitory dimetylacji steroli klasy I inhibitors of sterol dimethylation of class I	1* <i>Fusarium asiaticum</i> , <i>Fusarium graminearum</i> (Yin et al. 2009); <i>Fusarium solani</i> (Kalamarakis et al. 1991); <i>Microdochium (Fusarium) nivale</i> (Crisci et al. 1993)
8	Nieorganiczne Inorganic	tienchlorek miedziowy copper oxychloride	Miedzian 50 WP	około 1925 around 1925	systemiczne systemic	deaminazy adenyzy (zakłócenie syntezy kwasów nukleinowych) deaminases of adenosine (disruption of nucleic acid synthesis)	<i>Erysiphe graminis f.sp. hordei</i> – w środowisku (Hollomon 1979); <i>Sphaerotheca fuliginea</i> – w środowisku (O'Brien et al. 1988) <i>Erysiphe graminis f.sp. hordei</i> – in the environment (Hollomon 1979); <i>Sphaerotheca fuliginea</i> – in the environment (O'Brien et al. 1988)
9	Pochodne węglowodorów aromatycznych Derivatives of aromatic hydrocarbons	chlorotalonil chlorothalonil	Gwarant 500 SC	1966	kontakcyjne contact	niespecyficzna denaturacja białek i enzymów non-specific denaturation of proteins and enzymes	nieznane unknown
					kontakcyjne contact	inhibitory procesów oddechowych inhibitors of respiratory processes	niskie ryzyko ze względu na wielopunktowy mechanizm działania low risk due to multi-point mechanism of action

Lp. No.	Grupa fungicydów Group of fungicides	Substancja czynna Active substance	Preparat Preparation	Rok wprowadzenia substancji aktywnej Introduction date of active substance	Zakres działania Scope of activity	Mechanizm działania Mode of action	Rekomendacja stosowania w szkółkach leśnych Use recommendation in forest nurseries	Stwierdzona odporność na substancję aktywną Confirmed resistance to active substance
10	Pirydynokarboksamidyny (SDHI) Pyridinecarboxamides	boskalid boscalid	Signum 33 WG	2003		inhibitory procesów oddechowych, inhibitory cytochromu b mitochondrialnego kompleksu III inhibitors of respiratory processes, inhibitors of cytochrome b of mitochondrial complex III		<i>Alternaria alternata</i> (Avenot et Michailides 2007); <i>Cercospora cassicola</i> (Miyamoto et al. 2009); <i>Botrytis cinerea</i> (Yin et al. 2011); <i>Monilinia fructicola</i> (Chen et al. 2013)
11	Strobiluryny (QoI) Strobilurins (QoI)	piraklostrobina pyraclostrobin	Signum 33 WG	2001	systemiczne systemic	inhibitory procesów oddechowych, inhibitory dehydrogenazy bursztynianowej mitochondrialnego kompleksu II inhibitors of respiratory processes, inhibitors of succinate dehydrogenase of mitochondrial complex II	dzębu seedling blight / rust / grey mould / phytophthora / oak powdery mildew	30 gatunków grzybów patogennych 30 species of pathogenic fungi
12	Benzimidazole (MBC) Benzimidazoles (MBC)	tiofanat metylu thiophanate-methyl	Funaben Plus 03 PA	1970	systemiczne systemic	hamowanie podziałów komórkowych inhibition of cell multiplication	choroby i uszkodzenia gałęzi i pni diseases and damage of branches and trunks	wiele gatunków many species

niejących jednostek naukowo-badawczych, obowiązków monitoringu odporności grzybów na fungicydy w odniesieniu do wszystkich gałęzi produkcji roślin, minimalizując w ten sposób ryzyko jej występowania.

Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów.

Podziękowania i źródła finansowania

Projekt rozwojowy pt. “Stosowanie fosforynów jako elicytorów odporności na patogeny korzeni w szkółkach leśnych i drzewostanach” (nr rejestracyjny N R12 0098 10) został zrealizowany ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju oraz MNiSW w ramach badań statutowych UWM.

Literatura

- Aleksandrowicz-Trzcńska M. 2008. Wzrost naturalnych odnowień sosny zwyczajnej i stan ich mikoryz po chemicznej ochronie przed osutką. *Leśne Prace Badawcze (Forest Research Papers)* 69(1): 7–14.
- Ammermann E., Lorenz G., Schelberger K., Mueller B., Kirstgen R., Sauter H. 2000. BAS 500F: The new broad-spectrum fungicide with a new mode of action, in: BCPC. Conference, Pests & Diseases, p. 541–548.
- Angeles Diaz Borrás M., Vila Aguilar R. 1988. In-vitro resistance of *Phytophthora citrophthora* to metalaxyl and fosetyl-Al. *Alimentaria* 8: 71–73.
- Arvanites A.C., Boerth D. 2001. Modeling of the mechanism of nucleophilic aromatic substitution of fungicide chlorothalonil by glutathione. *Journal of Molecular Modeling* 7: 245–256. DOI 10.1007/s008940100032.
- Avenot H.F., Michailides T.J. 2007. Resistance to boscalid in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California. *Plant Disease* 91(10): 1345–1350. DOI 10.1094/PDIS-04-13-0459-RE.
- 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. DOI 10.1016/j.cropro.2010.02.019.
- Barak E., Edgington L.V. 1984. Cross resistance of *Botrytis cinerea* to captan, thiram, chlorothalonil and related fungicides. *Canadian Journal of Plant Pathology* 6: 318–320. DOI 10.1080/07060668409501536.
- Bard M., Lees N.D., Burrows L.S., Kleinhans F.W. 1978. Differences in crystal violet uptake and cation-induced death among yeast sterol mutants. *Journal Bacteriology* 135: 1146–1148.
- Barnes A.D., Kelley W.D. 1992. Effects of a triazole, uniconazol, on shoot elongation and root growth in loblolly pine. *Canadian Journal Forest Research* 22(1): 1–4. DOI 10.1139/x92-001.
- Blum M., Waldner M., Gisi U. 2010. A single point mutation in the novel PvCesA3 gene confers resistance to the carboxylic acid amide fungicide mandipropamid in *Plasmopara viticola*. *Fungal Genetics and Biology* 47: 499–510. DOI 10.1016/j.fgb.2010.02.009.
- Brent K. J. 1982. Case study 4: Powdery mildews of barley and cucumber. In: Fungicide Resistance in Crop Protection (eds. J. Dekker, S.G. Georgopoulos), Pudoc, Wageningen, 219–230.
- Brent K. J., Hollomon D.W. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? FRAC Monograph No. 1. Pp. 60.
- Brown S., Koike S.T., Ochoa O.E., Laemmlein F., Michelmore R.W. 2004. Insensitivity to the fungicide fosetyl-aluminum in California isolates of the lettuce downy mildew pathogen, *Bremia lactucae*. *Plant Disease* 88: 502–8. DOI 10.1094/PDIS.2004.88.5.502.
- Campagnac E., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A., Laruelle F., Durand R., Grandmougin-Ferjani A. 2009. Fenpropimorph slows down the sterol pathway and the development of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* 19(6): 365–374. DOI 10.1007/s00572-009-0238-1.
- Campagnac E., Fontaine J., Sahraoui A.L., Laruelle F., Durand R., Grandmougin-Ferjani A. 2008. Differential effects of fenpropimorph and fenhexamid, two sterol biosynthesis inhibitor fungicides, on arbuscular mycorrhizal development and sterol metabolism in carrot roots. *Phytochemistry* 69(17): 2912–2919. DOI 10.1016/j.phytochem.2008.09.009.
- Cardenas-Flores A., Cranenbrouck S., Draye X., Guillet A., Govaerts B., Declerck S. 2011. The sterol biosynthesis inhibitor molecule fenhexamid impacts the vegetative compatibility of *Glomus clarum*. *Mycorrhiza* 21(5): 443–449. DOI 10.1007/s00572-011-0385-z.
- Caux P.Y., Kent R.A., Fan G.T. 1996. Environmental fate and effects of chlorothalonil: a Canadian perspective. *Critical Review of Environmental Science and Technology* 26: 45–93. DOI 10.1080/10643389609388486.
- Chen F., Liu X., Chen S., Schnabel E., Schnabel G. 2013. Characterization of *Monilinia fructicola* strains resistant to both propiconazole and boscalid. *Plant Disease* 97: 645–651. DOI 10.1094/PDIS-10-12-0924-RE.
- Chen G. 2010. Laboratory evaluation of borate amine borate derivatives in wood for fungal decay. The International Research Group on Wood Protection, (Biarritz - France), IRG/WP 10-30543, 20 p.
- Chen L., Zhu S., Lu X., Pang Z., Cai M., Liu X. 2012. Assessing the Risk That *Phytophthora melonis* Can Develop a Point Mutation (V1109L) in Cesa3 Conferring Resistance to Carboxylic Acid Amide Fungicides. *PLoS ONE* 7(7): e42069. DOI 10.1371/journal.pone.0042069.
- Chen S.K., Edwards C. A., Subler S. 2001. Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biology and Biochemistry* 33(14): 1971–1980. DOI 10.1016/S0038-0717(01).
- Chen S.K., Edwards C.A. 2001. A microcosm approach to assess the effects of fungicides on soil ecological processes and plant growth: comparisons of two soil types. *Soil Biology and Biochemistry* 33(14): 1981–1991. DOI 10.1016/S0038-0717(01).
- Chiocchio V., Venedikian N., Martinez A. E., Menendez A., Ocampo J. A., Godeas A. 2000. Effect of the fungicide benomyl on spore germination and hyphal length of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *International Microbiology* 3: 173–175.
- Choi S.M., Ruddick J.N.R., Morris P.I. 2001. The possible role of mobile CCA components in preventing spore germination in checked surfaces, in treated wood exposed above ground. The International Research Group on Wood Preservation. (Nara-Japan). IRG/WP 01-30263, 16 p.
- Cobon G.S., Haslam J.M. 1973. The effect of altered membrane sterol composition on the temperature dependence of yeast mitochondrial ATPase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 52: 320–326. DOI 10.1016/0006-291X(73)90990-X.

- Cohen Y., Coffey M.D. 1986. Systemic fungicides and the control of *Oomycetes*. *Annual Review Phytopathology* 24: 311–338. DOI 10.1146/annurev.py.24.090186.001523.
- Coolbaugh R.C., Swanson D.I., West C.A. 1982. Comparative Effects of Ancymidol and Its Analogs on Growth of Peas and Ent-Kaurene Oxidation in Cell-Free Extracts of Immature *Marah Macrocarpus* Endosperm. *Plant Physiology* 69(3): 707–711. DOI 10.1104/pp.69.3.707.
- Cristani C., Gambogi P. 1993. Laboratory isolation of *Microdochium (Fusarium) nivale* mutants showing reduced sensitivity to sterol biosynthesis inhibitors. *Rivista di Patologia Vegetale* 3: 49–57.
- 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. DOI 10.1007/s10532-010-9430-4.
- Daniel R. Guest D. 2005. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67: 194–201. DOI 10.1016/j.pmpp.2006.01.003.
- Daniel R., Wilson B.A., Cahill D.M. 2005. Potassium phosphonate alters the defence response of *Xanthorrhoea australis* following infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology* 34: 541–558. DOI 10.1071/AP05074.
- Debieu D., Bach J., Lasseron A., Arnold A., Brousset S., Gredt M., Taton M., Rahier A., Malosse C., Leroux P. 2000. Inhibition of ergosterol biosynthesis by morpholine, piperidine, and spiroketalamine fungicides in *Microdochium nivale*: effect on sterol composition and sterol $\Delta 8 \rightarrow \Delta 7$ -isomerase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 67: 85–94. DOI 10.1006/pest.2000.2485.
- Delye C., Laigret F., Corio-Costet M.-F. 1997. A mutation in the 14₋demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Applied Environmental Microbiology* 63: 2966–2970.
- Dercks W., Creasy L. 1989. Influence of fosetyl-Al on phytoalexin accumulation in the Plasmopara viticola-grapevine interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34(3): 203–213. DOI 10.1016/0885-5765(89)90044-1.
- Derevagina M.K., Elanskij S.N., D'akov Y.T. 1999. Rezistentnost' *Phytophthora infestans* k fungicidu dimetorfustat'ã. *Mikologija i Fitopatologija* 33(3): 208–213.
- Dobrowolski M.P., Shearer B.L., Colquhoun I.J., O'Brien P.A. Hardy G.E.St.J. 2008. Selection for decreased sensitivity to phosphite in *Phytophthora cinnamomi* with prolonged use of fungicide. *Plant Pathology* 57: 928–936. DOI 10.1071/BT00062.
- Draper A., Cullinan P., Campbell C. 2003. Occupational asthma from fungicides fluazinam and chlorothalonil. *Occupational and Environmental Medicine* 60: 76–77.
- Edgington L.V. 1981. Structural Requirements of Systemic Fungicides. *Annual Review of Phytopathology* 19: 107–124. DOI 10.1146/annurev.py.19.090181.000543.
- EFSA. 2013. The 2010 European Union Report on Pesticide Residues in Food. *EFSA Journal* (3): 3130 [808 pp.].
- Eggers J., Juzwik J., Bernick S., Mordaunt L. 2005. Evaluation of propiconazole operational treatments of oaks for oak wilt control. Research Note NC-390. United States Department of Agriculture-Forest Service, North Central Research Station, 6 p.
- Elliott M.L. 1999. Effect of Demethylation Inhibiting Fungicides on 'Tifgreen' Bermudagrass Quality. *HortTechnology* 9(2): 195–197.
- Englander L., Merlino J.A., McGuire J.J. 1980. Efficacy of two new systemic fungicides and ethazole for control of *Phytophthora* root rot of rhododendron, and spread of *Phytophthora cinnamomi* in propagation benches. *Phytopathology* 70: 1175–1179. DOI 10.1094/Phyto-70-1175.
- Felsenstein F.G., Steden C., Speich J. 1994. Shifts in morpholine sensitivity of the wheat powdery mildew pathogen, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* and their influence on disease control. Proceedings of the Brighton Crop Protection. Conference - Pests & Diseases, 475–480.
- Fernández-Ortuño D., Torés J. A., de Vicente A., Pérez-García A. 2008. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology* 11(1): 1–9.
- Garbelotto M., Harnik T.Y., Schmidt D.J. 2009. Efficacy of phosphonic acid, metalaxyl-M and copper hydroxide against *Phytophthora ramorum* in vitro and in planta. *Plant Pathology* 58: 111–119. DOI 10.1111/j.1365-3059.2008.01894.x.
- Gibson I. A. S. 1958. Phytotoxic effects of copper fungicides on acid soils. *East African Agricultural Journal* 24(2): 125–127.
- Gisi U., Lamberth C., Mehl A., Seitz T. 2007. Carboxylic acid amide (CAA) fungicides. Modern crop protection compounds. Second Edition. Wiley-VCH Verlag. pp. 651–674.
- Glaab J., Kaiser W.M. 1999. Increased nitrate reductase activity in leaf tissue after application of the fungicide kresoxim-methyl. *Planta* 207(3): 442–448. DOI 10.1007/s004250050503.
- Głowacka B., Kolk A., Janiszewski W., Rosa-Gruszecka A., Pudelko M., Łukaszewicz J., Krajewski S. 2013. Środki ochrony roślin oraz produkty do rozkładu pni drzew leśnych zalecane do stosowania w leśnictwie w roku 2013. Instytut Badawczy Leśnictwa Analizy i Raporty-19. Wyd. IBL, 77 s.
- Görtz A., Oerke E.C., Puhl T., Steiner U. 2008. Effect of environmental conditions on plant growth regulator activity of fungicidal seed treatments of barley. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 82: 60–68.
- Grant B.R., Dunstan R.H., Griffith J.M., Niere J.O. Smillie R.H. 1990. The mechanism of phosphonic (phosphorous) acid action in *Phytophthora*. *Australasian Plant Pathology* 19(4): 115–121. DOI 10.1071/APP9900115.
- Grossman K., Kwiatkowski J., Caspar G. 1999. Regulation of phytohormone levels, leaf senescence and transpiration by the strobilurin kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Plant Physiology* 154(5-6): 805–808. DOI 10.1016/S0176-1617(99)80262-4.
- Guest D.I. Grant B. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Reviews* 66: 159–187. DOI 10.1111/j.1469-185X.1991.tb01139.x.
- Gullino M.L., Tinivella F., Garibaldi A., Kemmitt G.M., Bacci L., Sheppard B. 2010. Mancozeb past, present and future. *Plant Disease* 94(9): 1076–1087. DOI 10.1094/PDIS-94-9-1076.
- Hamamoto H., Hasegawa K., Nakaune R., Lee Y. J., Makizumi Y., Akutsu K., Hibi T. 2000. Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14₋demethylase gene (*CYP51*) in *Penicillium digitatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3421–3426.
- Hardy G.E.St.J., Barrett S., Shearer B.L. 2001. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology* 30: 133–139. DOI 10.1071/AP01012.
- Härtner H., Barth V. 1996. Effectiveness and synergistic effects between copper and polymer betaine. The International Research Group on Wood Preservation, IRG/WP 96- 30097.

- Hastrup A., Ch.S., Green I.I.F., Clausen C., Jensen B. 2005. *Serpula lacrymans* – the dry rot fungus tolerance towards copper-based wood preservatives. The International Research Group on Wood Protection, (Bangalore - India), IRG/WP 05-10555, 7 p.
- Haugen L., Stennes M. 1999. Fungicide injection to control Dutch elm disease: Understanding the options. *Plant Diagnostic Quarterly* 20: 29–38.
- Hollomon D. W. 1979. Evidence that ethirimol may interfere with adenine metabolism during primary infection of barley powdery mildew. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 10: 181–189. DOI: 10.1016/0048-3575(79)90020-8.
- Hollomon D. W., Chamberlain K. 1981. Hydroxypyrimidine fungicides inhibit adenosine deaminase in barley powdery mildew. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 16: 158–169. DOI: 10.1016/0048-3575.
- Hollomon D.W., Schmidt H.H. 1987. Modern selective fungicides: properties, applications, mechanisms of action. Longman Scientific & Technical Uniwersytet Cornell. pp.383.
- Hu J., Hong C. 2007. Effects of propamocarb hydrochloride on mycelial growth, sporulation, and infection by *Phytophthora nicotianae* isolates from Virginia nurseries. *Plant Disease* 91(4): 414–420. DOI 10.1094/PDIS-91-4-0414.
- James R.L., Woo J.Y. 1984. Fungicide trials to control Botrytis blight at nurseries in Idaho and Montana. *Tree Planter's Notes*: 35(4): 16–19.
- Joffrion T.M., Cushion M.T. 2010. Sterol biosynthesis and sterol uptake in the fungal pathogen *Pneumocystis carinii*. *FEMS Microbiology Letters* 311: 1–9. DOI 10.1111/j.1574-6968.2010.02007.x.
- Kalamarakis A.E., De Waard M.A., Ziogas B.N., Georgopoulos S.G. 1991. Resistance to fenarimol in *Nectria haematococca* var *curbitae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 40: 212 – 220. DOI 10.1016/0048-3575(91)90092-Z.
- Kerkenaar A. 1995. Mechanism of action of cyclic amine fungicides: morpholines and piperidines, in *Modern Selective Fungicides*. Lyr, H., Editor. Gustav Fischer Verlag: New York. p. 185–204.
- Kim Y.S., Dixon P., Vincelli P., Farman M.L. 2003. Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopathology* 93: 891–900. DOI 10.1094/PHYTO.2003.93.7.891.
- Köchle H., Grossmann K., Jabs T., Stierl R., Gerhard M., Kaiser W., Glaab J., Conrath U., Seehaus K., Herms S. 2003. Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants, in: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds III*. (eds. H. Lyr, P.E. Russell, H-W. Dehne, H.D. Sisler) Andover, 61–74.
- Koo B.S., Park H., Kalme S. 2009. α - and β -tubulin from *Phytophthora capsici* KACC 40483: molecular cloning, biochemical characterization, and antimicrotubule screening. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82(3): 513–524. DOI 10.1007/s00253-008-1821-7.
- Kuc T., Aleksandrowicz-Trzcńska M. 2012. Wpływ fungicydów stosowanych w ochronie przed mączniakiem prawdziwym na wzrost i kolonizację mikoryzową hodowanych w kontenerach sadzonek dębu. *Sylwan* 156(9): 672–683.
- Laatikainen T. 2006. Pesticide induced responses in ectomycorrhizal fungi and symbiont scots pine seedlings. *Koupio University Publications C. Natural and Environmental Sciences* 201: 180 p.
- Laatikainen T., Heinonen-Tanski H. 2002. Mycorrhizal growth in pure cultures in the presence of pesticides. *Microbiological Research* 157: 127–137. DOI 10.1078/0944-5013-00139.
- Lasseron-De Falandre A., Debieu D., Bach J., Malosse C., Leroux P. 1999. Mechanisms of resistance to fenpropimorph and terbinafine, two sterol biosynthesis inhibitors, in *Nectria haematococca*, a phytopathogenic fungus. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 64: 167–184. DOI 10.1006/pest.1999.2424.
- Lees N.D., Bard M., Kemple M.D., Haak R.A. Kleinhans F.W. 1979. ESR determination of membrane order parameter in yeast sterol mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* 553: 469–475. DOI 10.1016/0005-2736(79)90302-X.
- Leroux P., Chapeland F., Desbrosses D., Gredt M. 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection* 18: 687–697. DOI 10.1016/S0261-2194(99)00074-5.
- Li Y., Zhang H.Q., Liu J., Yang X.P., Liu Z.J. 2006. Stereoselective Synthesis and Antifungal Activities of (E)- α -(Methoxyimino) benzeneacetate Derivatives Containing 1,3,5-Substituted Pyrazole Ring. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 54: 3636–3640. DOI 10.1021/jf060074f.
- Ma Z., Michailides T.J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24: 853–863. DOI 10.1016/j.cropro.2005.01.011.
- Malita V. 2008. Naturally occurring enolethers. *Acta Chimica Slovaca* 1(1): 221–237.
- Manninen A.M., Laatikainen T., Holopainen T. 1998. Condition of Scots pine fine roots and mycorrhiza after fungicide application and low-level ozone exposure in a 2- year field experiment. *Trees* 12: 347–355. DOI 10.1007/s004680050161.
- Marshall J.A., Dennis A.L., Kumazawa T., Haynes A.M., Nes W.D. 2001. Soybean sterol composition and utilization by *Phytophthora sojae*. *Phytochemistry* 58: 423–428. DOI 10.1016/S0031-9422(01)00219-9.
- Martens D.A., Bremner J.M. 1997. Inhibitory effects of fungicides on hydrolysis of urea and nitrification of urea nitrogen in soil. *Pesticide Science* 49: 344–352. DOI 10.1002/(SICI)1096-9063(199704).
- May L.L., Kimati H. 2000. Controle de *Phytophthora parasitica* com fungicidas e efeito desses produtos no crescimento micelial de *Trichoderma*. *Summa Phytopathologica* 26: 52–57.
- McGrath M. T. 2001. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew, experiences and challenges. *Plant Disease* 85: 236–245. DOI 10.1094/PDIS.2001.85.3.236.
- McKay A.H., Hagerty G.C., Follas G.B., Moore M.S., Christie M.S., Beresford R.M. 2011. Succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) fungicide resistance prevention strategy. *New Zealand Plant Protection* 64: 119–124.
- Mellado E., Diaz-Guerra T.M., Cuenca-Esterella M., Rodriguez-Tudela J.L. 2001. Identification of two different 14_ sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2431–2438. DOI 10.1128/JCM.39.7.2431-2438.2001.
- Meng Q.X., Cui X.L., Bi Y., Wang Q., Hao J.J. 2011. Biological and genetic characterization of *Phytophthora capsici* mutants resistant to flumorph. *Plant Pathology* 60: 957–966. DOI 10.1111/j.1365-3059.2011.02454.x.
- Milenkovski S., Baath E., Lindgren P. E., Berglund O. 2010. Toxicity of fungicides to natural bacterial communities in wetland water and sediment measured using leucine incorporation and potential denitrification. *Ecotoxicology* 19(2): 285–294. DOI 10.1007/s10646-009-0411-5.
- Miyamoto T., Ishii H., Seko T., Kobori S., Tomita Y. 2009. Occurrence of *Corynespora cassicola* isolates resistant to boscalid on

- cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. *Plant Pathology* 58(6): 1144–1151. DOI 10.1111/j.1365-3059.2009.02151.x.
- Moore M.S., Follas G.B., Hagerly G.C., Beresford R.M. 2008. Carboxylic acid amide (CAA) fungicide resistance prevention strategy. *New Zealand Plant Protection* 61:134–136.
- Moorman G.W., Kang S., Geiser D.M., Kim S.H. 2002. Identification and characterisation of *Pythium* species associated with greenhouse floral crops in Pennsylvania. *Plant Disease* 86: 1227–1231. DOI 10.1094/PDIS.2002.86.11.1227.
- Napier B.A.S., Bayles R.A., Stigwood P.L. 2000. Sensitivity of powdery mildew and yellow rust to DMI, morpholine and strobilurin fungicides in England and Scotland. Proceedings of the BCPC Conference Pests & Diseases, 427–434.
- O'Brien R.G., Vawdrey L.L., Glass R.J. 1988. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew *Sphaerotheca fuliginea* and its effect on field control. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 28: 417–424. DOI 10.1071/EA9880417.
- Orbovic V., Achor D., Syvertsen J.P. 2007. Adjuvants Affect Penetration of Copper Through Isolated Cuticles of Citrus Leaves and Fruit. *Hortscience* 42(6): 1405–1408.
- Pap P., Rankovic B., Masirevic S. 2012. Significance and need of powdery mildew control (*Microsphaera alphitoides* Griff. et Maubl.) in the process of regeneration of the pedunculate oak (*Quercus robur* L.) stands in the Ravni Srem area. *Periodicum Biologorum* 114(1): 91–102.
- Papavizas G.C., O'Neill N.R., Lewis J.A. 1978. Fungistatic activity of propyl-N (alphanodimethylaminopropyl) carbamate on *Pythium* spp. and its reversal by sterols. *Phytopathology* 68: 1667–1671.
- Peacock K.L., Fulbright D.W. 2007. Effective longevity of propiconazole following injection into *Quercus rubra*. Pp. 181–190. In: Proceedings of the 2nd National Oak Wilt Symposium, Austin, Texas.
- Pilbeam R.A., Howard K., Shearer B.L., Hardy G.E.St.J. 2011. Phosphite stimulated histological responses of *Eucalyptus marginata* to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Trees - Structure and Function* 25: 1121–1131. DOI 10.1007/s00468-011-0587-1.
- Pommer E.H., 1995. Morpholine fungicides and related compounds, in: Modern Selective Fungicides—Properties, Applications, Mechanisms of Action (ed. H. Lyr.), Gustav Fisher—Verlag, Jena, Germany, 163–183.
- Rademacher W. 2000. Growth Retardants: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 501–531. DOI 10.1146/annurev.arplant.51.1.501.
- Rapp L., Richter J. 1982. Effect of propamocarb-hydrochloride (Previcur N) on several isolates of some *Pythium* and *Phytophthora* species in vitro and in vivo. *Journal for Plant Diseases and Plant Protection* 89: 487–497. DOI 10.1094/PDIS-91-4-0414.
- Rathinasamy K., Panda D. 2006. Suppression of microtubule dynamics by benomyl decreases tension across kinetochore pairs and induces apoptosis in cancer cells. *FEBS Journal* 273(17): 4114–4128. DOI 10.1111/j.1742-4658.2006.05413.x
- Rhodes L.H., Larser P.O. 1981. Effects of fungicides on mycorrhizal development of creeping bentgrass. *Plant Disease* 65: 145–147. DOI 10.1094/PD-65-145.
- Ruske R.E., Gooding M.J., Jones S.A. 2003. The effects of triazole and strobilurin fungicide programmes on nitrogen uptake, partitioning, remobilization and grain N accumulation in winter wheat cultivars. *The Journal of Agricultural Science* 140(4): 395–407. DOI 10.1017/s0021859603003228.
- Samoucha Y., Cohen Y. 1990. Toxicity of propamocarb to the late blight fungus on potato. *Phytoparasitica* 18: 27–40. DOI 10.1007/BF02980824.
- Schramm G., Steglich W., Anke T., Oberwinkler F. 1978. Antibiotika aus Basidiomyceten, III. Strobilurin A und B, antifungische Stoffwechselprodukte aus *Strobilurus tenacellus*. *Chemische Berichte* 111: 2779–2784. DOI 10.1002/cber.19781110806.
- Sierotzki H., Frey R., Wullschlegel J., Palermo S., Karlin S., Godwin J., Gisi U. 2006. Cytochrome *b* gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. *Pest Management Science* 63: 225–233. DOI 10.1002/ps.1330.
- Sigler W.V., Turco R.F. 2002. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied Soil Ecology* 21: 107–118. DOI 10.1016/j.chemosphere.2007.04.042.
- Smillie R., Grant B.R., Guest D. 1989. The mode of action of phosphite for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. *Phytopathology* 79: 921–926. DOI 10.1094/Phyto-79-921.
- Sreenivasa M.N., Bagyaraj D.J. 1989. Use of pesticides for mass production of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum. *Plant Soil* 119: 127–132. DOI 10.1007/BF02370276.
- Stammler G., Brix H. D., Glatzli A., Semar M., Schoefl U. 2007. Biological properties of the carboxamide boscalid including recent studies on its mode of action. in: *Proc. XVI Intentional Plant Protection Congress, Glasgow*, p 40–45.
- Tyler B.M., Tripathy S., Zhang X., Dehal P., Jiang R.H., Aerts A., Arredondo F.D., Baxter L., Bensasson D., Beynon J.L. 2006. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* 313: 1261–1266. DOI 10.1126/Science.1128796.
- Wang G., Liang B., Li F., Li S. 2011. Recent advances in the biodegradation of chlorothalonil. *Current Microbiology* 63(5): 450–457. DOI 10.1007/s00284-011-0001-7.
- Wang H.C., Sun H.Y., Stammler G., Ma J.X., Zhou M.G. 2009. Baseline and differential sensitivity of *Peronophythora litchii* (lychee downy blight) to three carboxylic acid amide fungicides. *Plant Pathology* 58: 571–576. DOI 10.1111/j.1365-3059.2008.01990.x.
- Wilde T.H. 1990. Propamocarb-HCl, a fungicide suitable for integrated pest management. Pages 303–306 in: *Tomato and Pepper Production in the Tropics*. Proc. Intl. Sympos. Integrated Management Practices. Taiwan.
- Wilkinson, C.J., Holmes, J.M., Dell, B., Tynan, K.M., McComb, J.A., Shearer, B.L., Colquhoun, I.J. and Hardy, G.E.St.J. 2001. Effect of phosphite on *in planta* zoospore production of *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* 50: 587–593. DOI 10.1046/j.1365-3059.2001.00605.x.
- Wilson A.D., Lester D.G. 2002. Trench inserts as long-term barriers to root transmission for control of oak wilt. *Plant Disease* 86: 1067–1074. DOI 10.1094/PDIS.2002.86.10.1067.
- Wong F.P., Wilcox W.F. 2001. Comparative physical modes of action of azoxystrobin, mancozeb, and metalaxyl against *Plasmopara viticola* (grapevine downy mildew). *Plant Disease* 85: 649–656. DOI 10.1094/pdis.2001.85.6.649.
- Wood H. M., Dickinson M. J., Lucas J. A., Dyer P.S. 2001. Cloning of the *CYP51* gene from the eyespot pathogen *Tapesia yallundae* indicates that resistance to the DMI fungicide prochloraz is not related to sequence changes in the gene encoding the target site enzyme. *FEMS Microbiology Letters* 196: 183–187. DOI 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10562.x.
- Wu Y.X., von Tiedemann A. 2002. Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone. *Environmental Pollution* 116(1): 37–47. DOI 10.1016/S0269-7491(01)00174-9.
- www.frac.info [9.12.2013].

- Xiong D., Li Y., Xiong Y., Li X., Xiao Y., Qin Z., Xiao Y. 2014. Influence of boscalid on the activities of soil enzymes and soil respiration. *European Journal of Soil Biology* 61: 1–5. DOI 10.1016/j.ejsobi.2013.12.006
- Yang C., Hamel C., Vujanovic V., Gan Y. 2011. Fungicide: Modes of Action and Possible Impact on Nontarget Microorganisms. *ISRN Ecology* 2011: 1–8. DOI 10.5402/2011/130289.
- Yin Y. N., Kim Y. K., Xiao C. L. 2011. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 101: 986–995. DOI: 10.1094/PHYTO-01-11-0016.
- Yin Y., Liu X., Li B., Ma Z. 2009. Characterization of sterol demethylation inhibitor-resistant isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* collected from wheat in China. *Phytopathology* 99(5): 487–497. DOI 10.1094/PHYTO-99-5-0487.
- Young D.H., Spiewak S.L., Slaweki R.A. 2001. Laboratory studies to assess the risk of development of resistance to zoxamide. *Pest Management Science* 57: 1081–1087. DOI 10.1002/ps.399.
- Zhang C.Q., Liu Y.H., Ma X.Y., Feng Z., Ma Z.H. 2009. Characterization of sensitivity of *Rhizoctonia solani*, causing rice sheath blight, to mepronil and boscalid. *Crop Protection* 28: 381–386. DOI 10.1016/j.cropro.2008.12.004.
- Zhang X., Gao Y.X., Liu H.J., Guo B.Y., Wang H.L. 2012. Design, Synthesis and Antifungal Activities of Novel Strobilurin Derivatives Containing Pyrimidine Moieties. *Bulletin of The Korean Chemical Society* 33(8): 2627–2634. DOI 10.3390/molecules190914036
- Zhu S., Liu P., Liu X., Li J., Yuan S., Si N. 2008. Assessing the risk of resistance in *Pseudoperonospora cubensis* to the fungicide flumorph in vitro. *Pest Management Science* 64(3): 255–261. DOI 10.1002/ps.1515.
- Zwiers L.-H., Stergiopoulos I., Van Nistelrooy J.G.M., De Waard M.A. 2002. ABC transporters and azole susceptibility in laboratory strains of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 46: 3900–3906. DOI 10.1128/AAC.46.12.3900-3906.2002.

Wkład autorów

A.O., T.O., A.P., J.N. – koncepcja pracy; A.O. – przygotowanie maszynopisu, T.O, J.N. – korekta tekstu pod kątem redakcyjnym i merytorycznym; A.P. – przygotowanie tabel oraz zbieranie materiałów.

Current possibilities and prospects of using fungicides in forestry

Adam Okorski^{1*}, Agnieszka Pszczółkowska¹, Tomasz Oszako², Justyna A. Nowakowska³

¹ University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Dept. of Diagnostics and Pathophysiology of Plants, Pl. Łódzki 5, 10–727 Olsztyn, Poland;

² Forest Research Institute, Forest Protection Department, Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05–090 Raszyn, Poland; ³ Forest Research Institute, Laboratory of Molecular Biology, Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05–090 Raszyn, Poland

*Tel. +48 89 5233511, e-mail: adam.okorski@uwm.edu.pl

Abstract. The possibility of using chemicals in European forestry is extremely limited due to the binding legal regulations and specific conditions concerning the market of plant protection products. This is reflected in the limited availability of active fungicides in forestry. Due to this limitation, practitioners using fungicides in forest nurseries and forest cultivation must have substantial knowledge of the biology of pathogens to ensure satisfactorily effective protection.

The work presented here provides an overview of the currently recommended fungicides in Polish forestry as well as the mechanisms of interaction between the active substances and the pathogen, the plant and mycorrhizal fungi. The risk of fungicide resistance, which has been insufficiently explored in the context of forest pathogens, is also discussed in this paper.

Keywords: forest protection, forest nurseries, fungicide resistance, fungicides mode of action

1. Introduction

Integrated protection of forest nurseries came into force by way of legal dispositions of the European Commission (Directive No 2009/128/WE dated on October 21, 2009 and the Regulation No 546/2011 dated on June 10, 2011 concerning the integrated plant protection against pests). The idea behind it consisted in the complementary usage of numerous (or all) possible plant protection methods. Therefore, the Ministry of Agriculture and Rural Development prepared a project of a national plan of action for the limitation of risk related to the use of plant protection chemicals for 2013–2017. Unfortunately, due to costly assessment processes concerning the influence of respective active substances on the environments (amounting to several millions of Euro) some of the producers resigned from taking the effort to register the plant protection chemicals. In result, the supply of the preparations available on the market decreased significantly. The forest practitioners have half the number of plant protection chemicals at their disposal. So what should be done in the event of limited choice of fungicides? This review lists preparations currently admitted to use in forestry and shows the mechanisms of their functioning and current

and potential effectiveness on different groups of pathogenic organisms, along with the simultaneous analysis of the possibility of fungicide resistance (organisms present in Poland and closely related to them).

2. Current state of chemical protection in forestry

The specificity of forest nursery cultivation causes that the risk of the existence of fungal pathogens menace for the saplings is considerably high, and at the same time, due to the minute range of cultivated plant species the accumulation of pathogenic factors may occur, while the limited stock of plant protection chemicals recommended for the use in forest nurseries brings about the situation where the fungicide treatment often proves ineffective. Currently the forest nursery uses a few fungicidally active compounds, (Fig. 1) which constitute an enormous challenge both for the practitioners and researchers whose task consists in the optimization of plant protection. This state of affairs is directly related to the policy of chemical companies, for whom high costs of the registration of fungicides in cultivations of small areas (such as nursery production) constitute a barrier blocking the introduction of innovative fungicides. Therefore nursery production most often

Received: 5.12.2013, reviewed: 27.03.2014, accepted: 31.07.2014.

takes advantage of the interventional fungicide treatment with the use of only a few active substances used for many years. Additionally, the necessity of repeating the treatment on the same plots of forest nurseries with active substances from the same group or of identical mechanism of interaction with the cells of fungi sanctions the pathogens resistant to the preparations. At the moment, the programme of the General Directorate of the State Forests of Poland is being implemented and concerns the intensification of the forest nursery production, where greater problems with pathogenic organism for plants should be expected.

The most important pathogens found in soils, which pose significant threat to the forest tree saplings are above all the fungi of the following genera: *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium* and *Cylindrocarpon*. Constraining their spread is extremely difficult due to high adaptability, large host scope and the presence of various infectious and endospore forms. The accumulation of pathogens in the soil niche in favourable weather conditions results in mass withering of saplings. For forest nurseries and cultivations, the existence of powdery mildew and downy mildew, and pine *needlecast* disease caused by *Lophodermium pinastri* and needle blight of larch caused by *Meria laricis* is unfavourable and may contribute to the decay of young saplings and the decrease of the value of plant material. Unfortunately, also with reference to those diseases, the choice of active substances of fungicides is limited.

3. Dithiocarbamates

The forest nurseries use above all preparations containing dithiocarbamates (Fig. 1), interacting with the fungal cells through disturbing various metabolic processes, the result of which is the inhibition of spore germination (Wong and Wilcox 2001).

Mankozeb belonging to dithiocarbamates in itself does not exhibit fungicidal activity but may be effective as the pre-fungicide, because when in contact with water it is decomposed, releasing sulfide ethylene bis-isothiocyanate (EBIS). This compound is then UV converted to ethylene bis-isothiocyanate (EIB). Both compounds are deemed as toxic and interact with the sulfhydryl groups of enzymes. Those reactions disturb basic enzymatic processes and lead to the death of cells. It is also believed that those compounds interfere with six various biochemical processes taking place in the cytoplasm and mitochondria of fungal cells (Gulliano et al. 2010).

Dithiocarbamates mechanism of action is multipoint, which causes that it is unusually advantageous from the practical point of view since it significantly reduces the possibility of the resistance of fungi conditioned upon the mutation of single genes. In such a case only the so called

polygene resistance may occur, caused by mutations in several genes, which may in turn trigger the mechanisms of detoxification of the active substance and lead to the occurrence of cross resistance (Gulliano et al. 2010).

The protective effect of that group of preparations is not however perfect, since they are contact substances and their effect is short-term. Despite the fact that preparations belonging to that group gained worldwide commercial success, due to the large scope of effectiveness in combating numerous groups of pathogens (*Ascomycetes*, *Oomycetes*, *Basidiomycetes* and *Deuteromycetes*), their effectiveness is high, however, only during early stages of infection.

4. Carboxylic acid amides (CAA)

The preparations belonging to the groups of CAA (carboxylic acid amides), to which dimethomorph belongs, were used for the first time at the beginning of the eighties.

The chemicals are effective in combat against *Oomycetes* from the family of *Peronosporaceae* (such as *Plasmopara viticola* and *Bremia lactucea*) as well as *Pythiaceae* (genus *Phytophthora*, but not *Pythium*) (Gisi 2007). Their activity consists in disturbing the phospholipid biosynthesis in fungal cells, which has an adverse influence on the process of the creation of the cell wall. Those preparations inhibit also all processes related to the asexual reproduction of fungi but do not influence the development and mobility of zoospores (Wang et al. 2009).

Studying the activity of dimethomorph in laboratory conditions, it was found that the strains of *Phytophthora capsici* were moderately resistant (Young, et al. 2001). In Russia, the resistant strains *Phytophthora infestans* (related to the most important late blight pathogens found in Poland) sprang into existence due to frequent treatment application with the use of dimethomorph as the active substance (Dereviagina et al. 1999). The Internet website (www.frac.info) belonging to the organization FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), associating researchers from all over the world, dealing with the phenomenon of fungi resistance to fungicides, revealed the information that the strains *P. infestans* are sensitive to the CAA preparations which is crucial for the forest officers and forest nurserymen (Moore, et al. 2008).

However, another species of fungi *Plasmopara viticola* proved to be completely resistant to any active substances from the CAA group (Moore, et al. 2008). This case is interesting because the resistance was broken due to the frequent repetition of protection treatment, which creates a real possibility of observing such a phenomenon in the case of other fungi. The resistance to CAA identified in laboratory conditions in the case of *P. viticola* is inherited recessively (Blum, et al. 2010), while in the case of *P. capsici* it is conditioned by two dominant genes (Meng, et al. 2011). The most

recent research carried out by Chen, et al. (2012) allowed for the identification, within the genome *P. melonis*, of the mutation related to the resistance to CAA preparations within the *CesA3* gene encoding a polypeptide made up of 1139 amino acids with a molecular mass of 126.5 kDa. The comparison of the amino acid sequences of isolates sensitive and resistant to CAA, proved the creation of mutation at the codon 1109 resulting in the conversion of amino acids: valine to leucine (Chen, et al. 2012). According to the authors the resistance to CAA of the *P. melonis* isolates may be controlled by the recessive gene(s), however, the confirmation of that thesis requires further genetic experiments (Chen, et al. 2012).

To sum up, the risk of increased resistance to active substances from the CAA group of *Oomycetes* on a large scale should be deemed as minute and may be additionally decreased by ceasing the repetition of protection treatment in short periods of time.

5. Carbamates

Carbamates are designated for combating *Pythium*, *Phytophthora*, *Aphanomyces* and some fungi from the *Fusarium* genus, i.e. pathogens causing wilt diseases of many plant species (Cohen and Coffey 1986, Englander et al. 1980, Rapp and Richter 1983).

The mechanism of propamocarb activity (Fig. 1), active substance from that group, consists in the disturbance of permeability of cell membranes of young mycelium, however, in the case of older mycelium or germinating spores in sporangium, its activity is not very effective (Papavizas, et al. 1978). Therefore propamocarb activity on plants strongly infested with *P. infestans* is invisible (Samoucha and Cohen 1990). The research results by Hu and Hong (2007) indicated that the preparation should be applied preventively in forest nursery before the infection of seedlings with zoospores. Propamocarb may slow down the disease process by inhibiting the production of spores (sporangia) and reducing zoospores activity. However, after the infection, the effect of the fungicide is lost because the treatment at this stage is not recommended, at the same time the risk that *Phytophthora* will get resistant increases. Prokamokarb does not have adverse effect on beneficial to plants microorganisms, which was proven with reference to the *Trichoderma* and mycorrhizal fungi (May and Kimati 2000, Wilde 1990). Therefore, the preparation should be used in the programmes of integrated protection against fungal diseases in forest nursery.

6. Phosphonates

Systematic preparations from the group of phosphonates (fosetyl aluminum and potassium salts of phosphoric acid)

(Fig. 1) belong to the most important chemicals designed for the reduction of diseases caused by fungi-forms *Oomycetes*, especially from the genus *Phytophthora*. Phosphonates are widely used in agriculture, horticulture, forestry and also in natural environment (Guest and Grant, 1991, Daniel et al. 2005). They are used in Africa, Asia, Australia, Europe and North America to protect rare and endangered species of plants and to protect crop. Those compounds in the form of water solution spray (along with the wetting agent) are also used in trees protection, or they are directly injected to the trunks, where they move in the plant tissues through phosphate pathway (Guest and Grant, 1991). Phosphonates are not metabolized by the plant, which results in the fact that they stay in the tissues for a considerable period of time (6–8 years), which is closely related to the species of the plant, its growth speed and the speed of losing leaves (Hardy et al. 2001). Those compounds have two different mechanisms of activity towards pathogen, depending on the amount of the active substance (Smillie, et al. 1989). High concentrations inhibit growth and sporulation of pathogens (Wilkinson, et al. 2001, Garbelotto et al. 2009); while low concentrations may indirectly stimulate the defence response of plants. Taking into consideration the fact that the concentrations of phosphonates in plant tissues rarely reach concentrations that had fungistatic qualities *in vitro*, stimulation of defence mechanisms seems to be of greater importance.

It was observed for a long time that the phosphonates action may be different as regards various plants grown by farmers, and one of the hypotheses says that the compounds above all stimulate defence mechanisms of an organism (Grant, et al. 1990, Daniel and Guest 2005). Fosetyl-Al is described in reference books as the elicitor of plant defence mechanism and its action results in the synthesis of phenol compounds in leaves. Dercks and Creasy (1989) provide the information that the activity of the compound in combating *P. viticola* was high, both in the pre-infection phase and after the infection. Comparing the activity of fosetyl-Al in the control of downy mildew on the grapevine varieties differing in resistance proved that the plant defence response was directly related to the ability of the plant to synthesize phytoalexins. The most resistant grapevine variety also strongly accumulated resveratrol in its tissues, which exerted very strong pressure on the fungus. The research by Dercks and Crease (1989) also showed a strong correlation between the plant resistance and the level of accumulation of resveratrol.

There is also a proof to the fact that the defence mechanisms of plants may be stimulated by the changes in pathogen metabolism. Research by Grant, et al. (1990) showed that low concentration of phosphonates may modify the metabolism of *Phytophthora* species without visible influence on the growth of mycelium. Guest and Grant (1991) hypothesized that the

preparations with phosphonates may exert influence on the pathogen by disturbing the synthesis of its suppressors, i.e. compounds ‘tricking’ the defence mechanism of the plant.

Very interesting, from the practical point of view, was the research carried out by Pilbeam, et al. (2011), which proved various reactions to infection triggered by *P. cinnamomi* when using phosphonates on resistant and susceptible line of eucalyptus. Phosphonates caused various histopathological responses in the tissues of eucalyptuses. Stimulation of mitosis, the creation callus and synthesis of lignin took place in resistant lines, while sensitive lines increased the production of lignin and suberin (Pilbeam, et al. 2011).

The risk of resistance of pathogenic *Oomyces* to preparations containing phosphonates due to its very intricate, non-specific mechanism of protective interaction is deemed as slight, however there are reports about diminished sensitivity of isolates *P. cinnamomi* (Dobrowolski et al. 2008) and *Bremia lactucae* (Brown et al. 2004).

7. Morpholines

Spiroksamina (Fig. 1) belongs to the morpholine preparations – an important group of fungicides having a large scope of usage directed towards powdery mildew, rust and scab (Pommer 1995). It exhibits the same way of the interaction with fungal cells and other active substances in the group (fenpropimorph, fenpropidine, tridemorph), site-specific inhibiting sterol biosynthesis (SBI class II) (Leroux et al. 1999). Sterols are a fundamental component of all cell membranes of eukaryotic organisms, and their presence is necessary for normal development (Joffrion and Cushion 2010). Sterols in fungi cells perform several functions: they are responsible for the fluidity and permeability of the cell membranes (Bard et al. 1978, Lees et al. 1979) and they regulate enzymes related to them (Cobon and Haslam 1973). Morpholines affect to varying degrees two specific points in the sterol biosynthesis pathway, inhibiting the metabolism dimethylergostatrienol to dimethylergostadienol by blocking $\Delta 14$ -reductase and fecosterol to episterol, by disrupting to the operation $\Delta^{8,7}$ – isomerase (Kerkenaar 1995).

The use of spiroxamine is recommended primarily to control of powdery mildew in different plant species, and in attempts to use it in the fight against other pathogenic fungi showed low efficiency of the active substance (Debieu et al. 2000).

There are many references in scientific books to the decrease of sensitivity of pathogenic fungi to fungicides containing morpholines: *Erysiphe graminis* (Felsenstein et al. 1994, Napier et al. 2000), *Microdochium nivale* (Debieu et al. 2000), *Botrytis cinerea* (Leroux et al. 1999), *Nectria haematococca* (Lasseron-De Felandre et al. 1999). Additionally due to the possibility of cross resistance in 2005, FRAC organization assessed the

risk of resistance to spiroxamine from low to moderate (www.frac.info). The problem of resistance to the preparations of the SBI group concerned the research of Zhu et al. (2008) which confirmed cross resistance to SBI in *Pseudoperonospora cubensis* (*Oomyces*). The resistant mutant strains were resistant to both flumorph and dimethomorph (various fungicides), and the results clearly indicate that this is the same mechanism of resistance, therefore the risk of resistance in this case should be considered as medium (Zhu et al. 2008).

Using the SBI preparations in forest nursery may carry some threats. In container nurseries, where the major problem is the occurrence of powdery mildew, morpholine substances can seep into nuggets of the substrate, which may lead to less efficient use of mycorrhizal vaccines. Morpholines used in laboratory conditions already in low dosages adversely affected the growth of slime mould and sporulation of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, which was related to the disturbance of sterols metabolism (Campagnac et al. 2009). Previous research carried out by the team under Campagnac (Campagnac et al. 2008) concerning morpholine preparations (fenpropimorph and fenhexamid), also showed a direct effect of the mentioned active substances on the degree of the mycorrhiza of roots by *Glomus intraradices*. Analyses conducted by researchers showed that the first of these preparations reduced this process dramatically (Campagnac et al. 2008). The use of fenhexamid also adversely affected another mycorrhizal species *Glomus larum* (Cardenas-Flores et al. 2011). The authors of the research found that high levels of concentration and the frequent repetition of treatments with the use of SBI fungicides has a negative impact on mycorrhizal fungi in soil (Cardenas-Flores et al. 2011).

The latest test results obtained by Kuc and Aleksandrowicz-Trzciska (2012) do not confirm the negative impact of fenhexamid on the development of ectomycorrhizal symbiosis. The authors report that the preparation Falcon 460 EC did not limit the mycorrhiza of oak seedlings with fungus *Hebeloma crustuliniforme*, on the contrary, the results indicate the possibility of stimulation of mycorrhiza formed spontaneously.

8. DMI preparations (triazoles)

Fungicides belonging to this group comprise about 30 active substances with high efficiency against a number of fungal pathogens. DMI preparations are used in reducing powdery mildew and fungi genera of rust and *Ustilaginaceae*, grey and white mould and other fungal pathogens that cause leaf spots.

Studies showed that triazole fungicides penetrate through the roots, stems and leaves, are absorbed in the xylem and moved acropetally in plants, and are not moved by phloem to roots, and therefore the mechanism of action of these substances should be defined as locally systemic (Edgington 1981).

Those compounds block the biosynthesis of sterols in fungal cells (Yang et al. 2011). The mechanism is based on the inhibition of 14- α sterol demethylase dependant on cytochrome P-450 at position 14 of lanosterol and to a lesser extent, on the inhibition of Δ^{24} -sterol methyltransferase (Elliott 1999). Most of the DMI fungicides inhibit cytochrome by attaching to the cysteine pocket in the active site of the enzyme. As the reference books indicate the field resistance to triazoles was found after about 10 years of use, in populations of powdery mildew and scab (Ma and Michailides 2005, McGrath 2001). Further research on fungal resistance to these fungicides helped to identify the forms of reduced sensitivity in populations: *Fusarium asiaticum* (Yin et al. 2009), *Fusarium solani* (Kalamarakis et al. 1991), *Microdochium nivale* (Cristani and Gambogi 1993). Due to spot interaction mechanism on the pathogen and a large variety of preparations of similar mechanism of action, the risk of obtaining resistance to the assessed preparations is medium with high probability of occurrence of cross resistance (www.frac.info).

Reference books say that DMI resistance mechanisms observed in populations of fungi include: mutation of the enzyme- 14 α -demethylase (CYP51) which leads to a reduction in the affinity of DMI with target protein (Dely et al. 1997), overexpression or increase of the number *CYP51* copies gene, results in an increased amount of the target enzyme (Hamamoto et al 2000), overexpression of transport proteins ATP-binding cassette (ABC) (efflux pumps) involved in transport of sugars, amino acids, proteins, peptides and metal ions (Zwiers et al. 2002), and unidentified resistance mechanisms to DMI (Mellado et al. 2001, Wood et al. 2001).

DMI preparations outside of the fungicide properties exhibit indirect action on bacterial cells, although they do not contain sterols. The research work showed that triticonazole stimulates proliferation of bacteria in the soil, while fenpropimorph and propiconazole completely inhibit the activity of the soil bacteria (Milenkovski et al. 2010).

Triazole compounds due to the mechanism of modifying the sterol pathway of different organisms also exhibit interaction similar to the effect of growth regulators on plants (Barnes and Kelley 1992 Coolbaugh et al. 1982). Some triazole formulations are used as plant growth retardants (growth inhibitors) (Rademacher 2000). The DMI action in this respect consists in the inhibition of the biosynthesis of gibberellins, which leads to the reduction of the elongation growth of roots and shoots (Görtz et al. 2008).

It turns out that despite the broad activity of DMI preparations influencing both the fungi, bacteria and plants, the triazole compounds do not indicate fungistatic interaction with *Oomycete*. Responsible for this is the large phylogenetic distance separating relevant fungi and *Oomycete*, which translates directly to the varying effectiveness of plant

protection chemicals in reduced occurrence of these distinct groups of organisms. *Phytophthora* cells and other species belonging to the *Oomycetes* do not contain ergosterol, and their genomes are not functional *CYP51* genes (Tyler et al. 2006). These organisms, however, have the ability to produce the squalene and to transform exogenous sterols, and therefore they can be regarded as auxotrophic organisms towards obtaining sterols (Marshall et al. 2001). *Oomycota* charge precursors for sterols of the host plant during infection in which a large family of extracellular proteins structurally related to the transfer of lipids act as agents. These proteins are involved in plant-pathogen relationships, and their presence results in activation of the pathogenesis of hypersensitivity reactions (Blein et al. 2002).

The triazoles are used in the nurseries and forest cultivation for intervention in the control of oak powdery mildew (*Erysiphe alphitoides*), pine needlecast disease (*Lophodermium pinastri*, *L. seditosum*) and needle blight of larch (*Meria laricis*) (Fig. 1).

There are also examples of the use of DMI preparation in older stands. In the U.S., propiconazole is used to control oak wilt *Chalara quercina*. The effectiveness of that active substance in this dangerous disease of oak trees was documented in research by Eggers et al. (2005) as well as Peacock and Fulbright (2007). Carrying out the treatment procedure consists in the introduction of a fungicide through macro- or micro-injection into the part of wood, involved in the transport of water (Wilson and Lester 2002). Implementation of microinjection involves the introduction of small volumes of concentrated active substance by micro-injectors through a drilled hole in wood. The number of microinjection depends on the diameter of the tree, and their distribution is even. The mechanism of the collection of fungicide through tree tissues is primarily passive, it may also be forced by injectors (Haugen and Stennes 1999). The microinjection procedure introduces concentrated active substances (4-8 ml) in a larger volume of water. Studies by Haugen and Stennes (1999) showed that large volumes of dilute fungicides are better distributed in the tissues of the trees and thus are more effective. The protective effect of prothioconazole in the decline of oak lasts for two years from the application of the product (Eggers et al. 2005), but its application is not effective when the roots are infected (Wilson and Lester 2002).

9. Aminopyrimidines

Aminopyrimidines constitute a group of systemic active substances effective against powdery mildews (*Erysiphales*), to a lesser extent used in the control of rust and the smut. Bupyrimate belongs to this group of fungicides whose mechanism of action consists in inhibiting the synthesis of nucleic acids (Hollomon 1979), by reducing the activity of adenosine deami-

nase (ADA), the enzyme involved in purine metabolism, which catalyzes the deamination of adenosine to inosine (Hollomon and Chamberlain 1981). It was proven that aminopyrimidine fungicides should be used in the early stages of infection, because they inhibit the appressoria and haustoria of powdery mildew, the use of this group of active ingredients may also be useful in the later stages of development, because they inhibit spore germination (Hollomon and Schmidt 1987).

The first aminopyrimidine preparations were introduced in about 1968, they were initially very effective in mitigating powdery mildew of cucumber (*Sphaerotheca fuliginea*), but after about two years due to the frequent repetition of protective measures, in the populations of *S. fuliginea*, the resistance to these active substances was observed (Brent 1982).

The occurrence of resistant forms to the aminopyrimidines was also confirmed in the population of powdery mildew of barley (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*) (Hollomon 1979). So far, the mechanism of fungal resistance to this group of active substances has remained unclear. Brent and Hollomon (2007) indicate that resistance of powdery mildew to aminopyrimidines may be less rapid, but should be defined as a continuous and progressive. According to the authors the pathogen population may return to the state of sensitivity to the preparation, if the protective treatments are performed less intensively with simultaneous use of other active substances (Brent and Hollomon 2007).

In conclusion, it should be noted that recommended for the control of powdery mildew and pine rash aminopyrimidine and triazole active substances, aimed at helping to reduce the incidence of these types of diseases, have extremely narrow mechanism of action to the fungus. Of course, the intensification of protective treatment in the situation when other preferred active ingredients are missing, may result in the occurrence of resistance to a larger scale. Additionally, reducing the occurrence of powdery mildew is extremely difficult because of the huge propagation potential (heavy sporulation), rapid life cycle and broad temperature and humidity preferences of this group of organisms. Inhibition of disease symptoms is achieved by frequent repetition of protective measures, while the limited access to active substances results in the need of a search for alternative methods to combat these pathogens (Pap et al. 2012).

10. Inorganic preparations (copper oxychloride)

Inorganic compounds are the oldest group of active substances used in plant disease control. The first reports on the use of organic copper date back to 1761 when copper sulfate (CuSO_4) was used in very high concentrations to protect wheat against the smut. Works on the use of copper in the control of plant diseases were continued by Prevost (1807),

who reported the inhibition of germination of spores of the smut. Further studies on the use of copper were carried out by a botanist, professor of Bordeaux Millardet who around the year of 1885 adopted 'Bordeaux mixture' ($3 \text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuSO}_4 \cdot \text{CaSO}_4$) to protect the vines against *Plasmopara viticola*. In subsequent years, copper preparations were also used in the potato late blight control. The greatest progress in the study of copper-preparations fell on years 1925–1935, when the active substances of this group were first patented.

Currently in plant protection, copper ions (Cu^{2+}) are used in the form of copper sulfate, copper oxide, copper naphthenate, copper oxychloride, copper (II) 8-hydroxyquinolate. Copper preparations are used to control: *Plasmopara viticola*, *Phytophthora infestans* and other fungi that cause leaf spots and in forestry to reduce the incidence of pine *needlecast* disease (Fig. 1).

The mechanism of interaction of copper on the fungal cells is complex. Copper ions have an affinity to various chemical groups found in fungal cells and react with thiol groups, resulting in non-specific denaturation of proteins and enzymes. They form stable complexes with the coenzymes and other biologically active compounds, which leads to a reduction in metabolic activity of fungi. Copper preparations limit the respiratory processes in the cells of fungi by inhibiting the formation of acetyl-CoA, interrupt process in the respiratory chain of phosphorylation and the same time inhibit the formation of ATP.

The effect of copper preparations is not limited to pathogenic fungi. The research with the use of copper oxychloride proved their negative impact on the population of mycorrhizal fungi *Glomus* spp. and *Arachis hypogea* L. (Sreenivasa and Bagyaraj 1989) as well as the neutral impact on species *Glomus fasciculatum* i *Agrostis palustris* L. (Rhodes and Larser 1981). The obtained different results of studies resulted from different impact of active substance on mycorrhizal fungi in different plant species (Rhodes and Larser 1981, Sreenivasa and Bagyaraj 1989).

Other research proved the decrease in the activity of soil microorganisms and the inhibiting impact of the copper preparations on ectomycorrhizal fungi in environmental tests on pine saplings (Manninen and et al. 1998). Further studies on copper oxychloride showed further reductions in the growth of mycorrhizal fungi: *Cantharellus cibarius*, *Corticium bicolor*, *Paxillus involutus* and *Suillus* (Laatikainen and Heinonen-Tanski 2002).

The several data also suggest the possibility of adverse effects of copper preparations on plants. Gibson (1958) showed that copper compounds used on acidic soils (copper oxychloride, copper oxide) had phytotoxic effect on pine species *Pinus radiata* and *P. patula*. Adverse interaction consisted in premature demise of the root apex, and eventually the death of plants; this mechanism has been still poorly understood (Orbovic et al. 2007).

Reference books provide the information that copper ions are effective against some fungi causing wood decay. From the study carried out by Chen (2010), it follows that defence

mechanism of a tree against fungi consists in the binding of copper and polysaccharides and lignins in the wood cell walls. Very good for this process is the migration of Cu^{2+} in wood (Choi et al. 2001). Copper preparations show lower effectiveness against white and brown rot of a tree, caused by fungi from the families *Antrodia* and *Serpula*, which create non-toxic crystals of copper oxalate through binding the copper ions (Hastrup et al. 2005). Improved efficiency of the organic copper preparations in reducing wood damaging fungi may be obtained by the combined use of the quaternary ammonium salts (QAC-active substances destroying bacteria, less effective for fungi), which in combination with copper ions produce a synergistic effect (Härtner and Barth, 1996).

11. Derivatives of aromatic hydrocarbons

Derivatives of aromatic hydrocarbons belong to the group of fungicides having a benzene ring in the molecule, as well as having a different activity against fungi. Chlorothalonil (TPN, -2, 4, 5, 6 tetrachloroisofthalonitrile) – was recorded for the first time as a fungicide in 1966 and was recommended for wide use in agriculture, horticulture and forestry all over the world (Wang et al. 2011). The preparation has a very broad spectrum of activity, mainly as a fungicide, and in particular as a powdery mildew control agent. It has also properties against bacteria, algae and insects. The exact mechanism of its action has not been known, but it can be characterized as an inactivation of the glutathione-related enzymes involved in the respiratory processes of fungal cells (Arvanites, Boerth 2001). Fungicide Resistance the Assessment of Risk (FRAC, www.frac.info) characterizes the preparation as a means of multipoint contact mechanism of acting against the pathogen, that causes low risk of occurrence the resistance in fungi populations. The studies also showed phytotoxic effect of the formulation compared to seedlings and cuttings of forest tree nurseries (James, Woo 1984). In the experiments, the phytotoxic effect of the preparation for tree seedlings in nurseries was also showed (James, Woo 1984). Adverse effect of the preparation in relation to tree seedlings was also confirmed by Laatikainen (2006), proving that chlorothalonil applied in the container nurseries reduced the growth of pine seedlings and delayed their development, and thus their hardening. The effect of the preparation was maintained for a long time; after two years, changes in the content of nitrogen and free amino acids in the pine seedlings were evident (Laatikainen 2006). It was also showed that chlorothalonil has highly toxic effect on soil fungi populations (Sigler, Turco, 2002), whereas in pure cultures it appeared to be highly toxic to ectomycorrhizal fungi (Laatikainen and Heinonen-Tanski, 2002). The above observations, however, were not confirmed during the experiments conducted by Aleksandrowicz-Trzcńska (2008),

in which chlorothalonil did not limit the development of mycorrhizas in the pine regeneration. TPN preparation is also highly toxic to fish, aquatic invertebrates and birds (Caux et al., 1996), as well as harmful to human being (Draper et al., 2003).

12. Pyridinecarboxamide inhibitors of succinate dehydrogenase (SDHI)

Introduction to use of first generation SDHI fungicides (inhibitors of mitochondrial complex II: carboxin and oxy-carboxin) dates back to the late sixties of XX century. These were compounds which inhibit respiratory processes, effective in combating diseases caused mainly by Basidiomycetes (Zhang et al. 2009). The target site of their action is the succinate dehydrogenase complex (SDH) in respiratory chain (complex II) in binding site of ubiquinone (SQR), due to the distortion of the electron transport, mitochondrial respiration is inhibited (Yin et al. 2011). The second generation inhibitors of succinate dehydrogenase which comprise boscalid (registered in 2003), are the preparations with a broad spectrum of activity against pathogenic fungi to many crop species (Avenot, Michailides 2010). The preparation is bound in a waxy layer of cuticle, as well as moves in the tissue at the inner side of the leaves. According to the EFSA report, boscalid is the fourth most common pesticide present in food (EFSA 2013). Undoubtedly, the popularity of the product translates into a high risk of genetically conditioned resistance. FRAC organization assesses the risk of resistance to SDHI preparations from medium to high (www.frac.info), therefore for basic FRAC research, an obligation to monitor the plant resistance to pathogenic fungi on SDHI preparations was introduced.

In accordance with the recommendations of FRAC, due to the presence of cross-resistance within the SDHI group, the preparations should be used prophylactically if the risk of the disease is high. They should not be used in emergency, particularly when the pathogen population is large (McKay et al. 2011). These preparations should be used up to 2 times during the growing season best in combination with another active ingredient, or alternatively with substances from other groups that do not exhibit cross-resistance (McKay et al. 2011). SDHI preparations do not exhibit cross resistance with other classes of fungicides: strobilurin, anilopyrimidines and benzimidazole, therefore, in order to eliminate any of resistant strains, they should be used in combination with other active substances. (Stammler et al. 2007).

The recent studies on the action of boscalid on soil-forming processes showed that it is a persistent compound with little mobility having a negative impact on conversion of phosphorus and carbon as well as respiratory processes in soils (Xiong et al. 2014).

13. Strobilurin fungicides

Strobilurins are one of the most important groups of fungicides with the wide antimycotic spectrum, effective against Ascomycetes, Basidiomycetes and Oomycetes. For the first time, strobilurin (azoxystrobin) was obtained in 1977 from the mycelium of *Strobilurus tenacellus*, a species of decaying wood (Schramm et al., 1978). So far, about 20 strobilurin analogs have been isolated from basidiomycetes such as *Oudemansia iellamucida*, *Pterula* sp., *Xerula longipes*, *Mycena crocota*, *Favolaschia calocera* and ascomycetes, for example *Bolinea lutea* (Malita, 2008). Fungicides belonging to this group are highly prized for strong activity, low toxicity to mammalian cells and environmentally sound (Zhang et al. 2012).

Strobilurins act by inhibiting mitochondrial respiration in fungi cells. They interfere with the energy processes by blocking electron transfer through mitochondrial membrane, between cytochrome b and cytochrome c1 at the site of oxidation of quinol (Qo), thereby preventing the formation of ATP, which interrupts the energy cycle of the pathogen (Ammermann et al., 2000).

Pyraclostrobin is a fungicide from the group of strobilurins, which acts as a brake on the growth of hyphae and sporulation (Ammermann et al. 2000). In plants it moves in vascular system and translaminary (moves from one side of a leaf to the other). Strobilurins also regulate plant growth and development. It was demonstrated that pyraclostrobin applied to healthy plants caused an increase in the biomass due to the increased nitrogen uptake (Köehle et al. 2003). It was also shown that QoI fungicides inhibit respiration in plants (Glaab and Kaiser 1999), and produce other physiological changes like modification of plant hormones leading to the delay of leaf senescence (Ruske et al. 2003). Preparations of this group reduce stomatal conductance and reduce water consumption, leading to an increase in the photosynthetic activity of the plants (Grossman et al. 1999), and they increase the activity of antioxidant enzymes (Wu, Tiedemann 2002). Highly specific mechanism of strobilurins action on fungal cells and their frequent application promote rapid immunization of pathogens to this group of fungicides. The resistance mechanism is noted throughout the world in populations of pathogens of crops, fruits, vegetables, ornamental plants and grasses (Fernández-Ortuño et al. 2008), and the risk of its occurrence is rated very high. The FRAC monographs revealed the information that field resistance to strobilurins was identified in populations of more than 30 species of fungi pathogenic to plants (www.frac.info). It was demonstrated that for the resistance to the QoI preparations are responsible point mutations (single nucleotide polymorphism) in the cytochrome b gene sequence: leading to the conversion of three amino acids: glycine to alanine change at position 143 (G143A), the conversion of phenylalanine to leucine at position 129 (F129L) and exchange of glycine for arginine at position 137 (G137R) (Kim et al. 2003,

Sierotzki et al. 2006). The effect of these mutations is an alternative respiration and increased activity of the transport protein in ATP-binding cassette (ABC) membrane-associated cellular responsible for the mechanism of naturalization of fungicides (Fernández-Ortuño et al. 2008). Some FRAC publications include the information indicating how to use the QoI fungicides to minimize the risk of resistance of pathogenic fungi. Due to the high efficiency in inhibiting spore germination, these preparations should be used prophylactically. They can be used alone (in blocks with other fungicides), or alternatively with preparations from different group of cross resistance. QoI preparations can also be used in admixture with other active compounds, but only those which have a different mechanism of action on the cells of the pathogen, which broadens the spectrum of protective treatment and improves its efficiency. Active substances to be combined with strobilurins should be chosen in such a way that their efficiency on the target population of pathogens in the separate application would be high (www.frac.info). Currently, much effort has been focused on modifying the structure of the strobilurin in order to obtain new compounds with antifungal properties that are effective on the populations of resistant pathogens. Research shows that an effective way to acquire new strobilurins are modifications of the side chain (Li et al. 2006).

14. Benzimidazoles (MBC)

Benzimidazoles are a group of systemic fungicides developed in 1968, showing high activity against vascular and soil borne pathogens. It is a group of fungicidal preparations, the benzimidazoles contain in their chemical structure both benzene and imidazole rings. In fungal cell they inhibit cell multiplication (Yang et al. 2011). MBC fungicides bind β -tubulin in microtubules and inhibit their proliferation (Koo et al. 2009), which disrupts the mitotic spindle assembly of mikotubul, cellular transport and the formation and function of the cytoskeleton (Rathinasamy and Panda, 2006). Thiophanate-methyl belonging to the group of MBC fungicides is a systemic preparation with broad spectrum of antifungal properties. It is used in the protection of cereals, gardening, horticulture and forestry, as well as in the protection of timber (Cycoń et al. 2011).

The first signs of fungal resistance to MBC group of preparations were recorded in 1973, and now the resistance has been identified in the case of many phytopathogens species. In most cases, it was associated with the presence of point mutations in the β -tubulin gene, which led to amino acid changes in the binding site of the benzimidazole. Literature data show that the resistance of many plant pathogenic fungi to MBC is often due to mutations in codon 6, 50, 167, 198, 200 and 240 of β -tubulin (Ma, Michailides 2005). Resistance to MBC has characteristics of cross resistance to all preparations belonging to this group (www.frac.info).

Table 1. Fungicides used in forest nurseries (Głowacka et al. 2013)

No.	Group of fungicides	Active substance	Preparation	Introduction date of active substance	Scope of activity	Mode of action	Use recommendation in forest nurseries	Confirmed resistance to active substance		
1	Carboxylic acid amides	dimetomorph	Acrobat MZ	around 1980	deep-seated	inhibition of cellulose synthesis in Oomycetes	seedling blight	resistance of <i>Phytophthora capsici</i> in laboratory conditions (Young et al. 2001); <i>Plasmopara viticola</i> in the environment		
		69 WG								
		mankozeb	around 1960						contact	
2	Dithiocarbamates	mankozeb	Penncozeb 80 WP	around 1960	contact	disturbance of metabolic processes, inhibition of spore germination	seedling blight / phytophthora disease / shed of pine needles	low risk due to multi-point mechanism of action, <i>Botrytis cinerea</i> – resistance under laboratory conditions (Barak et Edgington 1984)		
		thiram	75 DS/WS						around 1960	contact
		thiram	Thiram Granuflo 8 WG						around 1960	contact
		methiram	Polyram 70 WG						around 1960	contact
3	Carbamates	promao carb	Previcur Energy 840 SL	1978	systemic	disturbance of permeability of cell membranes	seedling blight – pine	<i>Pythium</i> spp. in the environment (Moorman et al. 2002, 2004);		
4	Phosphonics	fostyl aluminum		1977	systemic	direct fungistatic-high doses, indirect elicitors or suppressors		<i>Phytophthora citrophthora</i> under laboratory conditions (Angeles Diaz Borrás et Vila Aguilar 1988)		

No.	Group of fungicides	Active substance	Preparation	Introduction date of active substance	Scope of activity	Mode of action	Use recommendation in forest nurseries	Confirmed resistance to active substance
5	Ketamines (morpholines)	spiroxamine		1999	sterol biosynthesis inhibitors of class II			<i>Erysiphe graminis tritici</i> (Napier et al. 2000); <i>Nectria haematococca</i> under laboratory conditions (Lasseron-De Felandre et al. 1999)
			Falcon 460 EC/ Sokót 460 EC				oak powdery mildew / pine needlecast	
6	DMI (triazole)	tebukonazole		1986	systemic	inhibitors of sterol dimethylation of class I		1* <i>Fusarium asiaticum</i> , <i>Fusarium graminearum</i> (Yin et al. 2009); <i>Fusarium solani</i> (Kalamarakis et al. 1991); <i>Microdochium (Fusarium) nivale</i> (Crisci et al. 1993)
			triadimenol		1973			
7	Pyrimidine	buprimate	Nimrod 250 EC	1976	systemic	deminases of adenosine (disruption of nucleic acid synthesis)	oak powdery mildew	<i>Erysiphe graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> – in the environment (Hollomon 1979); <i>Sphaerotheca fuliginea</i> – in the environment (O'Brien et al. 1988)
8	Inorganic	copper oxychloride	Miedzian 50 WP	around 1925	contact	non-specific denaturation of proteins and enzymes	larch needlecast	unknown
9	Derivatives of aromatic hydrocarbons	chlorothal-nile	Gwarant 500 SC	1966	contact	inhibitors of respiratory processes	seedling blight / leaf spots disease / grey mould / pine needlecast	low risk due to multi-point mechanism of action

No.	Group of fungicides	Active substance	Preparation	Introduction date of active substance	Scope of activity	Mode of action	Use recommendation in forest nurseries	Confirmed resistance to active substance
10	Pyridinecarboxamides	boscalid	Signum 33 WG	2003	inhibitors of respiratory processes, inhibitors of cytochrome b of mitochondrial complex III	seedling blight / rust / grey mould / phytophthora / oak powdery mildew	<i>Alternaria alternata</i> (Avenot et Michalides 2007); <i>Cercospora cassicola</i> (Miyamoto et al. 2009); <i>Botrytis cinerea</i> (Yin et al. 2011); <i>Monilinia fructicola</i> (Chen et al. 2013)	
11	Strobilurins (QoI)	pyraclostrobin	Signum 33 WG	2001	inhibitors of respiratory processes, inhibitors of succinate dehydrogenase of mitochondrial complex II	30 species of pathogenic fungi		
12	Benzimidazoles (MBC)	thiophanate-methyl	Funaben Plus 03 PA	1970	inhibition of cell multiplication	diseases and damage of branches and trunks	many species	

Although there is no evidence of a direct negative impact of MBC preparations on the soil bacteria population, it was shown that the presence of MBC fungicides in the soil inhibits nitrification mediated by bacteria (Chen et al. 2001). However, the negative effect on mycorrhizae fungi was clearly demonstrated e.g. in the case of the arbuscular species - *Glomus mosseae* after the use of the half of the dose of the fungicide from the MBC group the inhibition of the growth of mycelium and spore formation was observed (Chiocchio et al. 2000).

15. Summing up

The use of fungicides is currently the most effective method of reducing of plant pathogenic organisms. However, the forest nursery production due to the limited size, is not an attractive market for fungicide manufacturers, which is expressed in a small number of preparations available in an organized forestry production. Undoubtedly, some antidote to cure this situation is the obligation to apply the principles of Integrated Pest Management (IPM), which applies to all branches of organized crop production. On the other hand, modern forest nurseries, due to the ever-increasing production, suffer from the presence of increasing number of diseases, resulting in financial losses. Therefore the use of alternative protection methods to improve the quality of phytosanitary nursery products (free of pests) as well as lobbying to introduce by producers modern fungicides with a broad spectrum of activity more often and faster to nursery production are essential. At the same time in order to preserve the principles of good plant protection practice, the duty of monitoring fungicide resistance development with the help of existing research units should be mandatory for all branches of plant production and thus minimize the risk of its occurrence.

Conflict of interests

The authors declare absence of potential conflict of interests.

Acknowledgments and financial sources

Development project ‘The use of phosphite as effectors of resistance to root pathogens in nurseries and stands’, registration No N R12 0098 10, was carried out on behalf of the National Center for Research and Development and the statutory UWM research funded by the Ministry .

References

Aleksandrowicz-Trzcińska M. 2008. Wzrost naturalnych odnowień sosny zwyczajnej i stan ich mikoryz po chemicznej ochronie przed osutką. *Leśne Prace Badawcze (Forest Research Papers)* 69(1): 7–14.

- Ammermann E., Lorenz G., Schelberger K., Mueller B., Kirstgen R., Sauter H. 2000. BAS 500F: The new broad-spectrum fungicide with a new mode of action, in: BCPC. Conference, Pests & Diseases, p. 541–548.
- Angeles Diaz Borrás M., Vila Aguilar R. 1988. In-vitro resistance of *Phytophthora citrophthora* to metalaxyl and fosetyl-Al. *Alimentaria* 8: 71–73.
- Arvanites A.C., Boerth D. 2001. Modeling of the mechanism of nucleophilic aromatic substitution of fungicide chlorothalonil by glutathione. *Journal of Molecular Modeling* 7: 245–256. DOI 10.1007/s008940100032.
- Avenot H.F., Michailides T.J. 2007. Resistance to boscalid in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California. *Plant Disease* 91(10): 1345–1350. DOI 10.1094/PDIS-04-13-0459-RE.
- 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. DOI 10.1016/j.cropro.2010.02.019.
- Barak E., Edgington L.V. 1984. Cross resistance of *Botrytis cinerea* to captan, thiram, chlorothalonil and related fungicides. *Canadian Journal of Plant Pathology* 6: 318–320. DOI 10.1080/07060668409501536.
- Bard M., Lees N.D., Burrows L.S., Kleinhans F.W. 1978. Differences in crystal violet uptake and cation-induced death among yeast sterol mutants. *Journal Bacteriology* 135: 1146–1148.
- Barnes A.D., Kelley W.D. 1992. Effects of a triazole, uniconazole, on shoot elongation and root growth in loblolly pine. *Canadian Journal Forest Research* 22(1): 1–4. DOI 10.1139/x92-001.
- Blum M., Waldner M., Gisi U. 2010. A single point mutation in the novel PvCesA3 gene confers resistance to the carboxylic acid amide fungicide mandipropamid in *Plasmopara viticola*. *Fungal Genetics and Biology* 47: 499–510. DOI 10.1016/j.fgb.2010.02.009.
- Brent K. J. 1982. Case study 4: Powdery mildews of barley and cucumber. In: *Fungicide Resistance in Crop Protection* (eds. J. Dekker, S.G. Georgopoulos), Pudoc, Wageningen, 219–230.
- Brent K. J., Hollomon D.W. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? *FRAC Monograph No. 1*. Pp. 60.
- Brown S., Koike S.T., Ochoa O.E., Laemmlen F., Michelmore R.W. 2004. Insensitivity to the fungicide fosetyl-aluminum in California isolates of the lettuce downy mildew pathogen, *Bremia lactucae*. *Plant Disease* 88: 502–8. DOI 10.1094/PDIS.2004.88.5.502.
- Campagnac E., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A., Laruelle F., Durand R., Grandmougin-Ferjani A. 2009. Fenpropimorph slows down the sterol pathway and the development of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* 19(6): 365–374. DOI 10.1007/s00572-009-0238-1.
- Campagnac E., Fontaine J., Sahraoui A.L., Laruelle F., Durand R., Grandmougin-Ferjani A. 2008. Differential effects of fenpropimorph and fenhexamid, two sterol biosynthesis inhibitor fungicides, on arbuscular mycorrhizal development and sterol metabolism in carrot roots. *Phytochemistry* 69(17): 2912–2919. DOI 10.1016/j.phytochem.2008.09.009.
- Cardenas-Flores A., Cranenbrouck S., Draye X., Guillet A., Govaerts B., Declerck S. 2011. The sterol biosynthesis inhibitor

- moleculę fenhexamid wpływa na kompatybilność wegetatywną *Glomus clarum*. *Mycorrhiza* 21(5): 443–449. DOI 10.1007/s00572-011-0385-z.
- Caux P.Y., Kent R.A., Fan G.T. 1996. Environmental fate and effects of chlorothalonil: a Canadian perspective. *Critical Review of Environmental Science and Technology* 26: 45–93. DOI 10.1080/10643389609388486.
- Chen F., Liu X., Chen S., Schnabel E., Schnabel G. 2013. Characterization of *Monilinia fructicola* strains resistant to both propiconazole and boscalid. *Plant Disease* 97: 645–651. DOI 10.1094/PDIS-10-12-0924-RE.
- Chen G. 2010. Laboratory evaluation of borate amine borate derivatives in wood for fungal decay. The International Research Group on Wood Protection, (Biarritz - France), IRG/WP 10-30543, 20 p.
- Chen L., Zhu S., Lu X., Pang Z., Cai M., Liu X. 2012. Assessing the Risk That *Phytophthora melonis* Can Develop a Point Mutation (V1109L) in Cesa3 Conferring Resistance to Carboxylic Acid Amide Fungicides. *PLoS ONE* 7(7): e42069. DOI 10.1371/journal.pone.0042069.
- Chen S.K., Edwards C. A., Subler S. 2001. Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biology and Biochemistry* 33(14): 1971–1980. DOI 10.1016/S0038-0717(01).
- Chen S.K., Edwards C.A. 2001. A microcosm approach to assess the effects of fungicides on soil ecological processes and plant growth: comparisons of two soil types. *Soil Biology and Biochemistry* 33(14): 1981–1991. DOI 10.1016/S0038-0717(01).
- Chiocchio V., Venedikian N., Martinez A. E., Menendez A., Ocampo J. A., Godeas A. 2000. Effect of the fungicide benomyl on spore germination and hyphal length of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *International Microbiology* 3: 173–175.
- Choi S.M., Ruddick J.N.R., Morris P.I. 2001. The possible role of mobile CCA components in preventing spore germination in checked surfaces, in treated wood exposed above ground. The International Research Group on Wood Preservation. (Nara-Japan). IRG/WP 01-30263, 16 p.
- Cobon G.S., Haslam J.M. 1973. The effect of altered membrane sterol composition on the temperature dependence of yeast mitochondrial ATPase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 52: 320–326. DOI 10.1016/0006-291X(73)90990-X.
- Cohen Y., Coffey M.D. 1986. Systemic fungicides and the control of *Oomycetes*. *Annual Review Phytopathology* 24: 311–338. DOI 10.1146/annurev.py.24.090186.001523.
- Coolbaugh R.C., Swanson D.I., West C.A. 1982. Comparative Effects of Ancymidol and Its Analogs on Growth of Peas and Entkaurene Oxidation in Cell-Free Extracts of Immature *Marah Macrocarpus* Endosperm. *Plant Physiology* 69(3): 707–711. DOI 10.1104/pp.69.3.707.
- Cristani C., Gambogi P. 1993. Laboratory isolation of *Microdochium (Fusarium) nivale* mutants showing reduced sensitivity to sterol biosynthesis inhibitors. *Rivista di Patologia Vegetale* 3: 49–57.
- 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. DOI 10.1007/s10532-010-9430-4.
- Daniel R. Guest D. 2005. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67: 194–201. DOI 10.1016/j.pmp.2006.01.003.
- Daniel R., Wilson B.A., Cahill D.M. 2005. Potassium phosphonate alters the defence response of *Xanthorrhoea australis* following infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology* 34: 541–558. DOI 10.1071/AP05074.
- Debieu D., Bach J., Lasseron A., Arnold A., Brousset S., Gredt M., Taton M., Rahier A., Malosse C., Leroux P. 2000. Inhibition of ergosterol biosynthesis by morpholine, piperidine, and spiroketalamine fungicides in *Microdochium nivale*: effect on sterol composition and sterol $\Delta 8 \rightarrow \Delta 7$ -isomerase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 67: 85–94. DOI 10.1006/pest.2000.2485.
- Delye C., Laigret F., Corio-Costet M.-F. 1997. A mutation in the 14₋-demethylase gene of *Ucinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Applied Environmental Microbiology* 63: 2966–2970.
- Dercks W., Creasy L. 1989. Influence of fosetyl-Al on phytoalexin accumulation in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34(3): 203–213. DOI 10.1016/0885-5765(89)90044-1.
- Derevågina M.K., Elanskij S.N., D’akov Y.T. 1999. Rezistentnost’ *Phytophthora infestans* k fungicidu dimetorfustat’ã. *Mikologija i Fitopatologija* 33(3): 208–213.
- Dobrowolski M.P., Shearer B.L., Colquhoun I.J., O’Brien P.A. Hardy G.E.St.J 2008. Selection for decreased sensitivity to phosphite in *Phytophthora cinnamomi* with prolonged use of fungicide. *Plant Pathology* 57: 928–936. DOI 10.1071/BT00062.
- Draper A., Cullinan P., Campbell C. 2003. Occupational asthma from fungicides fluazinam and chlorothalonil. *Occupational and Environmental Medicine* 60: 76–77.
- Edgington L.V. 1981. Structural Requirements of Systemic Fungicides. *Annual Review of Phytopathology* 19: 107–124. DOI 10.1146/annurev.py.19.090181.000543.
- EFSA. 2013. The 2010 European Union Report on Pesticide Residues in Food. EFSA Journal (3): 3130 [808 pp.].
- Eggers J., Juzwik J., Bernick S., Mordaunt L. 2005. Evaluation of propiconazole operational treatments of oaks for oak wilt control. Research Note NC-390. United States Department of Agriculture-Forest Service, North Central Research Station, 6 p.
- Elliott M.L. 1999. Effect of Demethylation Inhibiting Fungicides on ‘Tifgreen’ Bermudagrass Quality. *HortTechnology* 9(2): 195–197.
- Englander L., Merlino J.A., McGuire J.J. 1980. Efficacy of two new systemic fungicides and ethazole for control of *Phytophthora* root rot of rhododendron, and spread of *Phytophthora cinnamomi* in propagation benches. *Phytopathology* 70: 1175–1179. DOI 10.1094/Phyto-70-1175.
- Felsenstein F.G., Steden C., Speich J. 1994. Shifts in morpholine sensitivity of the wheat powdery mildew pathogen, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* and their influence on disease control. Proceedings of the Brighton Crop Protection. Conference - Pests & Diseases, 475–480.
- Fernández-Ortuño D., Torés J. A., de Vicente A., Pérez-García A. 2008. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology* 11(1): 1–9.

- Garbelotto M., Harnik T.Y., Schmidt D.J. 2009. Efficacy of phosphonic acid, metalaxyl-M and copper hydroxide against *Phytophthora ramorum* in vitro and in planta. *Plant Pathology* 58: 111–119. DOI 10.1111/j.1365-3059.2008.01894.x.
- Gibson I. A. S. 1958. Phytotoxic effects of copper fungicides on acid soils. *East African Agricultural Journal* 24(2): 125–127.
- Gisi U., Lamberth C., Mehl A., Seitz T. 2007. Carboxylic acid amide (CAA) fungicides. Modern crop protection compounds. Second Edition. Wiley-VCH Verlag. pp. 651–674.
- Glaab J., Kaiser W.M. 1999. Increased nitrate reductase activity in leaf tissue after application of the fungicide kresoxim-methyl. *Planta* 207(3): 442–448. DOI 10.1007/s004250050503.
- Głowacka B., Kolk A., Janiszewski W., Rosa-Gruszecka A., Pudelko M., Łukaszewicz J., Krajewski S. 2013. Środki ochrony roślin oraz produkty do rozkładu pni drzew leśnych zalecane do stosowania w leśnictwie w roku 2013. Instytut Badawczy Leśnictwa Analizy i Raporty-19. Wyd. IBL, 77 s.
- Görtz A., Oerke E.C., Puhl T., Steiner U. 2008. Effect of environmental conditions on plant growth regulator activity of fungicidal seed treatments of barley. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 82: 60–68.
- Grant B.R., Dunstan R.H., Griffith J.M., Niere J.O., Smillie R.H. 1990. The mechanism of phosphonic (phosphorous) acid action in *Phytophthora*. *Australasian Plant Pathology* 19(4): 115–121. DOI 10.1071/APP9900115.
- Grossman K., Kwiatkowski J., Caspar G. 1999. Regulation of phytohormone levels, leaf senescence and transpiration by the strobilurin kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Plant Physiology* 154(5-6): 805–808. DOI 10.1016/S0176-1617(99)80262-4.
- Guest D.I., Grant B. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Reviews* 66: 159–187. DOI 10.1111/j.1469-185X.1991.tb01139.x.
- Gullino M.L., Tinivella F., Garibaldi A., Kemmitt G.M., Bacci L., Sheppard B. 2010. Mancozeb past, present and future. *Plant Disease* 94(9): 1076–1087. DOI 10.1094/PDIS-94-9-1076.
- Hamamoto H., Hasegawa K., Nakaune R., Lee Y. J., Makizumi Y., Akutsu K., Hibi T. 2000. Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14 α -demethylase gene (*CYP51*) in *Penicillium digitatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3421–3426.
- Hardy G.E.St.J., Barrett S., Shearer B.L. 2001. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology* 30: 133–139. DOI 10.1071/AP01012.
- Härtner H., Barth V. 1996. Effectiveness and synergistic effects between copper and polymer betaine. The International Research Group on Wood Preservation, IRG/WP 96-30097.
- Hastrup A., Ch.S., Green I.I.I.F., Clausen C., Jensen B. 2005. *Serpula lacrymans* – the dry rot fungus tolerance towards copper-based wood preservatives. The International Research Group on Wood Protection, (Bangalore - India), IRG/WP 05-10555, 7 p.
- Haugen L., Stennes M. 1999. Fungicide injection to control Dutch elm disease: Understanding the options. *Plant Diagnosticians Quarterly* 20: 29–38.
- Hollomon D. W. 1979. Evidence that ethirimol may interfere with adenine metabolism during primary infection of barley powdery mildew. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 10: 181–189. DOI: 10.1016/0048-3575(79)90020-8.
- Hollomon D. W., Chamberlain K. 1981. Hydroxypyrimidine fungicides inhibit adenosine deaminase in barley powdery mildew. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 16: 158–169. DOI: 10.1016/0048-3575.
- Hollomon D.W., Schmidt H.H. 1987. Modern selective fungicides: properties, applications, mechanisms of action. Longman Scientific & Technical Uniwersytet Cornell. pp.383.
- Hu J., Hong C. 2007. Effects of propamocarb hydrochloride on mycelial growth, sporulation, and infection by *Phytophthora nicotianae* isolates from Virginia nurseries. *Plant Disease* 91(4): 414–420. DOI 10.1094/PDIS-91-4-0414.
- James R.L., Woo J.Y. 1984. Fungicide trials to control Botrytis blight at nurseries in Idaho and Montana. *Tree Planter's Notes*: 35(4): 16–19.
- Joffrion T.M., Cushion M.T. 2010. Sterol biosynthesis and sterol uptake in the fungal pathogen *Pneumocystis carinii*. *FEMS Microbiology Letters* 311: 1–9. DOI 10.1111/j.1574-6968.2010.02007.x.
- Kalamarakis A.E., De Waard M.A., Ziogas B.N., Georgopoulos S.G. 1991. Resistance to fenarimol in *Nectria haematococca* var *cucurbitae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 40: 212–220. DOI 10.1016/0048-3575(91)90092-Z.
- Kerkenaar A. 1995. Mechanism of action of cyclic amine fungicides: morpholines and piperidines, in *Modern Selective Fungicides*. Lyr, H., Editor. Gustav Fischer Verlag: New York. p. 185–204.
- Kim Y.S., Dixon P., Vincelli P., Farman M.L. 2003. Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopathology* 93: 891–900. DOI 10.1094/PHYTO.2003.93.7.891.
- Köehle H., Grossmann K., Jabs T., Stierl R., Gerhard M., Kaiser W., Glaab J., Conrath U., Seehaus K., Herms S. 2003. Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants, in: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds III*. (eds. H. Lyr, P.E. Russell, H-W. Dehne, H.D. Sisler) Andover, 61–74.
- Koo B.S., Park H., Kalme S. 2009. α - and β -tubulin from *Phytophthora capsici* KACC 40483: molecular cloning, biochemical characterization, and antimicrotubule screening. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82(3): 513–524. DOI 10.1007/s00253-008-1821-7.
- Kuc T., Aleksandrowicz-Trzcińska M. 2012. Wpływ fungicydów stosowanych w ochronie przed mączniakiem prawdziwym na wzrost i kolonizację mikoryzową hodowanych w kontenerach sadzonek dębu. *Sylwan* 156(9): 672–683.
- Laatikainen T. 2006. Pesticide induced responses in ectomycorrhizal fungi and symbiont Scots pine seedlings. *Koupio University Publications C. Natural and Environmental Sciences* 201: 180 p.
- Laatikainen T., Heinonen-Tanski H. 2002. Mycorrhizal growth in pure cultures in the presence of pesticides. *Microbiological Research* 157: 127–137. DOI 10.1078/0944-5013-00139.
- Lasseron-De Falandre A., Debieu D., Bach J., Malosse C., Leroux P. 1999. Mechanisms of resistance to fenpropimorph and terbinafine, two sterol biosynthesis inhibitors, in *Nectria haematococca*, a phytopathogenic fungus. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 64: 167–184. DOI 10.1006/pest.1999.2424.
- Lees N.D., Bard M., Kemple M.D., Haak R.A., Kleinhans F.W. 1979. ESR determination of membrane order parameter in

- yeast sterol mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* 553: 469–475. DOI 10.1016/0005-2736(79)90302-X.
- Leroux P., Chapeland F., Desbrosses D., Gredt M. 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection* 18: 687–697. DOI 10.1016/S0261-2194(99)00074-5.
- Li Y.; Zhang H.Q., Liu J., Yang X.P., Liu Z.J. 2006. Stereoselective Synthesis and Antifungal Activities of (*E*)- α -(Methoxyimino) benzeneacetate Derivatives Containing 1,3,5-Substituted Pyrazole Ring. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 54: 3636–3640. DOI 10.1021/jf060074f.
- Ma Z., Michailides T.J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24: 853–863. DOI 10.1016/j.cropro.2005.01.011.
- Malita V. 2008. Naturally occurring enolethers. *Acta Chimica Slovaca* 1(1): 221–237.
- Manninen A.M., Laatikainen T., Holopainen T. 1998. Condition of Scots pine fine roots and mycorrhiza after fungicide application and low-level ozone exposure in a 2- year field experiment. *Trees* 12: 347–355. DOI 10.1007/s004680050161.
- Marshall J.A., Dennis A.L., Kumazawa T., Haynes A.M., Nes W.D. 2001. Soybean sterol composition and utilization by *Phytophthora sojae*. *Phytochemistry* 58: 423–428. DOI 10.1016/S0031-9422(01)00219-9.
- Martens D.A., Bremner J.M. 1997. Inhibitory effects of fungicides on hydrolysis of urea and nitrification of urea nitrogen in soil. *Pesticide Science* 49: 344–352. DOI 10.1002/(SICI)1096-9063(199704).
- May L.L., Kimati H. 2000. Controle de *Phytophthora parasitica* com fungicidas e efeito desses produtos no crescimento micelial de *Trichoderma*. *Summa Phytopathologica* 26: 52–57.
- McGrath M. T. 2001. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew, experiences and challenges. *Plant Disease* 85: 236–245. DOI 10.1094/PDIS.2001.85.3.236.
- McKay A.H., Hagerty G.C., Follas G.B., Moore M.S., Christie M.S., Beresford R.M. 2011. Succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) fungicide resistance prevention strategy. *New Zealand Plant Protection* 64: 119–124.
- Mellado E., Diaz-Guerra T.M., Cuenca-Esterella M., Rodriguez-Tudela J.L. 2001. Identification of two different 14- sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2431–2438. DOI 10.1128/JCM.39.7.2431-2438.2001.
- Meng Q.X., Cui X.L., Bi Y., Wang Q., Hao J.J. 2011. Biological and genetic characterization of *Phytophthora capsici* mutants resistant to flumorph. *Plant Pathology* 60: 957–966. DOI 10.1111/j.1365-3059.2011.02454.x.
- Milenkovski S., Baath E., Lindgren P. E., Berglund O. 2010. Toxicity of fungicides to natural bacterial communities in wetland water and sediment measured using leucine incorporation and potential denitrification. *Ecotoxicology* 19(2): 285–294. DOI 10.1007/s10646-009-0411-5.
- Miyamoto T., Ishii H., Seko T., Kobori S., Tomita Y. 2009. Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. *Plant Pathology* 58(6): 1144–1151. DOI 10.1111/j.1365-3059.2009.02151.x.
- Moore M.S., Follas G.B., Hagerty G.C., Beresford R.M. 2008. Carboxylic acid amide (CAA) fungicide resistance prevention strategy. *New Zealand Plant Protection* 61:134–136.
- Moorman G.W., Kang S., Geiser D.M., Kim S.H. 2002. Identification and characterisation of *Pythium* species associated with greenhouse floral crops in Pennsylvania. *Plant Disease* 86: 1227–1231. DOI 10.1094/PDIS.2002.86.11.1227.
- Napier B.A.S., Bayles R.A., Stigwood P.L. 2000. Sensitivity of powdery mildew and yellow rust to DMI, morpholine and strobilurin fungicides in England and Scotland. Proceedings of the BCPC Conference Pests & Diseases, 427–434.
- O'Brien R.G., Vawdrey L.L., Glass R.J. 1988. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew *Sphaerotheca fuliginea* and its effect on field control. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 28: 417–424. DOI 10.1071/EA9880417.
- Orbovic V., Achor D., Syvertsen J.P. 2007. Adjuvants Affect Penetration of Copper Through Isolated Cuticles of Citrus Leaves and Fruit. *Hortscience* 42(6): 1405–1408.
- Pap P., Rankovic B., Masirevic S. 2012. Significance and need of powdery mildew control (*Microsphaera alphitoides* Griff. et Maubl.) in the process of regeneration of the pedunculate oak (*Quercus robur* L.) stands in the Ravni Srem area. *Periodicum Biologorum* 114(1): 91–102.
- Papavizas G.C., O'Neill N.R., Lewis J.A. 1978. Fungistatic activity of propyl-N (alphan-dimethylaminopropyl) carbamate on *Pythium* spp. and its reversal by sterols. *Phytopathology* 68: 1667–1671.
- Peacock K.L., Fulbright D.W. 2007. Effective longevity of propiconazole following injection into *Quercus rubra*. Pp. 181–190. In: Proceedings of the 2nd National Oak Wilt Symposium, Austin, Texas.
- Pilbeam R.A., Howard K., Shearer B.L. Hardy G.E.St.J. 2011. Phosphate stimulated histological responses of *Eucalyptus marginata* to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Trees - Structure and Function* 25: 1121–1131. DOI 10.1007/s00468-011-0587-1.
- Pommer E.H., 1995. Morpholine fungicides and related compounds, in: Modern Selective Fungicides—Properties, Applications, Mechanisms of Action (ed. H. Lyr.), Gustav Fisher-Verlag, Jena, Germany, 163–183.
- Rademacher W. 2000. Growth Retardants: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 501–531. DOI 10.1146/annurev.arplant.51.1.501.
- Rapp L., Richter J. 1982. Effect of propamocarb-hydrochloride (Previcur N) on several isolates of some *Pythium* and *Phytophthora* species in vitro and in vivo. *Journal for Plant Diseases and Plant Protection* 89: 487–497. DOI 10.1094/PDIS-91-4-0414.
- Rathinasamy K., Panda D. 2006. Suppression of microtubule dynamics by benomyl decreases tension across kinetochore pairs and induces apoptosis in cancer cells. *FEBS Journal* 273(17): 4114–4128. DOI 10.1111/j.1742-4658.2006.05413.x
- Rhodes L.H., Larser P.O. 1981. Effects of fungicides on mycorrhizal development of creeping bentgrass. *Plant Disease* 65: 145–147. DOI 10.1094/PD-65-145.
- Ruske R.E., Gooding M.J., Jones S.A. 2003. The effects of triazole and strobilurin fungicide programmes on nitrogen uptake, partitioning, remobilization and grain N accumulation in winter

- wheat cultivars. *The Journal of Agricultural Science* 140(4): 395–407. DOI 10.1017/s0021859603003228.
- Samoucha Y., Cohen Y. 1990. Toxicity of propamocarb to the late blight fungus on potato. *Phytoparasitica* 18: 27–40. DOI 10.1007/BF02980824.
- Schramm G., Steglich W., Anke T., Oberwinkler F. 1978. Antibiotika aus Basidiomyceten, III. Strobilurin A und B, antifungische Stoffwechselprodukte aus *Strobilurus tenacellus*. *Chemische Berichte* 111: 2779–2784. DOI 10.1002/cber.19781110806.
- Sierotzki H., Frey R., Wullschlegel J., Palermo S., Karlin S., Godwin J., Gisi U. 2006. Cytochrome *b* gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. *Pest Management Science* 63: 225–233. DOI 10.1002/ps.1330.
- Sigler W.V., Turco R.F. 2002. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied Soil Ecology* 21: 107–118. DOI 10.1016/j.chemosphere.2007.04.042.
- Smillie R., Grant B.R., Guest D. 1989. The mode of action of phosphite: evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. *Phytopathology* 79: 921–926. DOI 10.1094/Phyto-79-921.
- Sreenivasa M.N., Bagyaraj D.J. 1989. Use of pesticides for mass production of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum. *Plant Soil* 119: 127–132. DOI 10.1007/BF02370276.
- Stammler G., Brix H. D., Glatli A., Semar M., Schoefl U. 2007. Biological properties of the carboxamide boscalid including recent studies on its mode of action. in: *Proc. XVI Intentional Plant Protection Congress, Glasgow*, p 40–45.
- Tyler B.M., Tripathy S., Zhang X., Dehal P., Jiang R.H., Aerts A., Arredondo F.D., Baxter L., Bensasson D., Beynon J.L. 2006. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* 313: 1261–1266. DOI 10.1126/Science.1128796.
- Wang G., Liang B., Li F., Li S. 2011. Recent advances in the biodegradation of chlorothalonil. *Current Microbiology* 63(5): 450–457. DOI 10.1007/s00284-011-0001-7.
- Wang H.C., Sun H.Y., Stammler G., Ma J.X., Zhou M.G. 2009. Baseline and differential sensitivity of *Peronophythora litchii* (lychee downy blight) to three carboxylic acid amide fungicides. *Plant Pathology* 58: 571–576. DOI 10.1111/j.1365-3059.2008.01990.x.
- Wilde T.H. 1990. Propamocarb-HCl, a fungicide suitable for integrated pest management. Pages 303–306 in: *Tomato and Pepper Production in the Tropics*. Proc. Intl. Sympos. Integrated Management Practices. Taiwan.
- Wilkinson, C.J., Holmes, J.M., Dell, B., Tynan, K.M., McComb, J.A., Shearer, B.L., Colquhoun, I.J. and Hardy, G.E.St.J. 2001. Effect of phosphite on *in planta* zoospore production of *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* 50: 587–593. DOI 10.1046/j.1365-3059.2001.00605.x.
- Wilson A.D., Lester D.G. 2002. Trench inserts as long-term barriers to root transmission for control of oak wilt. *Plant Disease* 86: 1067–1074. DOI 10.1094/PDIS.2002.86.10.1067.
- Wong F.P., Wilcox W.F. 2001. Comparative physical modes of action of azoxystrobin, mancozeb, and metalaxyl against *Plasmopara viticola* (grapevine downy mildew). *Plant Disease* 85: 649–656. DOI 10.1094/pdis.2001.85.6.649.
- Wood H. M., Dickinson M. J., Lucas J. A., Dyer P.S. 2001. Cloning of the *CYP51* gene from the eyespot pathogen *Tapesia yallundae* indicates that resistance to the DMI fungicide prochloraz is not related to sequence changes in the gene encoding the target site enzyme. *FEMS Microbiology Letters* 196: 183–187. DOI 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10562.x.
- Wu Y.X., von Tiedemann A. 2002. Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone. *Environmental Pollution* 116(1): 37–47. DOI 10.1016/S0269-7491(01)00174-9.
- www.frac.info [9.12.2013].
- Xiong D., Li Y., Xiong Y., Li X., Xiao Y., Qin Z., Xiao Y. 2014. Influence of boscalid on the activities of soil enzymes and soil respiration. *European Journal of Soil Biology* 61: 1–5. DOI 10.1016/j.ejsobi.2013.12.006
- Yang C., Hamel C., Vujanovic V., Gan Y. 2011. Fungicide: Modes of Action and Possible Impact on Nontarget Microorganisms. *ISRN Ecology* 2011: 1–8. DOI 10.5402/2011/130289.
- Yin Y. N., Kim Y. K., Xiao C. L. 2011. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 101: 986–995. DOI: 10.1094/PHYTO-01-11-0016.
- Yin Y., Liu X., Li B., Ma Z. 2009. Characterization of sterol demethylation inhibitor-resistant isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* collected from wheat in China. *Phytopathology* 99(5): 487–497. DOI 10.1094/PHYTO-99-5-0487.
- Young D.H., Spiewak S.L., Slawacki R.A. 2001. Laboratory studies to assess the risk of development of resistance to zoxamide. *Pest Management Science* 57: 1081–1087. DOI 10.1002/ps.399.
- Zhang C.Q., Liu Y.H., Ma X.Y., Feng Z., Ma Z.H. 2009. Characterization of sensitivity of *Rhizoctonia solani*, causing rice sheath blight, to mepronil and boscalid. *Crop Protection* 28: 381–386. DOI 10.1016/j.cropro.2008.12.004.
- Zhang X., Gao Y.X., Liu H.J., Guo B.Y., Wang H.L. 2012. Design, Synthesis and Antifungal Activities of Novel Strobilurin Derivatives Containing Pyrimidine Moieties. *Bulletin of The Korean Chemical Society* 33(8): 2627–2634. DOI 10.3390/molecules190914036
- Zhu S., Liu P., Liu X., Li J., Yuan S., Si N. 2008. Assessing the risk of resistance in *Pseudoperonospora cubensis* to the fungicide flumorph *in vitro*. *Pest Management Science* 64(3): 255–261. DOI 10.1002/ps.1515.
- Zwiers L.-H., Stergiopoulos I., Van Nistelrooy J.G.M., De Waard M.A. 2002. ABC transporters and azole susceptibility in laboratory strains of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 46: 3900–3906. DOI 10.1128/AAC.46.12.3900-3906.2002.

Author's contribution

A.O., T.O., A.P., J.N. – study conception; A.O.– manuscript preparation, T.O, J.N.– editing, proofreading; A.P. – data table preparation, data collecting.