

Katedra Ochrony Roślin, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin, Polska

* e-mail: weronika.kursa@up.lublin.pl

WERONIKA KURSA ^{*}, AGNIESZKA JAMIOŁKOWSKA ,
BARBARA SKWARYŁO-BEDNARZ 

Laboratoryjna ocena oddziaływania substancji czynnych fungicydów na wzrost niektórych grzybów chorobotwórczych

Laboratory evaluation of the effect of active fungicide ingredients
on the growth of some phytopathogenic fungi

Streszczenie. Celem pracy jest laboratoryjna ocena skuteczności fungicydalnego oddziaływania azoksystrobiny (Amistar 250 SC) i difenokonazolu (Score 250 EC) na wybrane grzyby fitopatogeniczne (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium avenaceum*). W badaniu zastosowano metodę zatrutych podłoży. Oddziaływanie azoksystrobiny i difenokonazolu na wzrost grzybów zależało od gatunku grzyba i dawki substancji toksycznej w podłożu. Testowane substancje czynne nie wykazywały działania fungicydalnego, lecz działanie fungistatyczne, najbardziej skuteczne w stężeniach 0,01% i 0,1%. Difenokonazol działał efektywniej niż azoksystrobina. Obie substancje czynne hamowały wzrost *A. alternata* i *B. cinerea* w zakresie od 3,85% do 88,07%, zależnie od dawki substancji czynnej i czasu jej działania. Azoksystrobina nie hamowała wzrostu powierzchniowego *F. avenaceum*, natomiast difenokonazol wykazywał słabe działanie fungistatyczne. Najwyższy stopień zahamowania wzrostu *F. avenaceum* zanotowany dla 0,1% stężenia difenokonazolu to 39,75%.

Słowa kluczowe: grzyby chorobotwórcze, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium avenaceum*, azoksystrobina, difenokonazol

WSTĘP

Problemy związane ze zmianami klimatu oraz zanieczyszczeniem środowiska naturalnego, powodują konieczność poszukiwania nowych, efektywnych działań w rolnictwie [Wrzaszcz i Prandecki 2020]. W tym względzie w 2019 r. Komisja Europejska zaprezentowała nową strategię rozwojową dla Europy o nazwie „Europejski zielony ład” [Pralińska i in. 2020]. W jej ramach przyjęto pakiet działań, wśród których strategia „Od pola do stołu” zakłada ochronę środowiska naturalnego, m.in. poprzez ograniczenie stosowania

pestycydów o 50% i zredukowanie wykorzystania nawozów chemicznych o 20% już do 2030 r. [Montanarella i Panagos 2021]. Zgodnie z polityką Unii Europejskiej (UE) związki, które mają negatywne oddziaływanie na układ hormonalny człowieka i zwierząt stałocięplnych oraz wykazują brak selektywności dla zapylaczy i organizmów pożytecznych, są wycofywane ze stosowania. W 2020 r., na mocy wielu rozporządzeń wykonawczych Komisji UE, z rejestru środków dopuszczonych do stosowania w ochronie roślin wycofano aż 24 substancje czynne pestycydów [Komunikat MRiRW 2022]. Pestycydy są wycofywane z rynku fitosanitarnego nie tylko ze względu ich szkodliwość dla środowiska, ale również brak efektywnego działania względem agrofagów. Chemiczne środki ochrony roślin, stosowane już ponad pół wieku, coraz częściej wywołują zjawisko odporności wśród organizmów szkodliwych. Wiąże się to nie tylko z właściwościami fizycznymi i chemicznymi substancji czynnych pestycydów (mechanizm działania), ale zależy również od wrażliwości/oporności gatunków, a nawet ich szczepów, na substancję toksyczną [Zamojska i Malinowski 2012]. Powstawanie odporności agrofagów na pestycydy wynika z fizjologicznej i genetycznej zmienności organizmów i ich przystosowania do warunków bytowania. Trwałość odporności w populacji zależy od wirulencji i przeżywalności form odpornych i wrażliwych, liczby generacji w sezonie wegetacyjnym oraz mobilności mutacyjnej organizmu. Powstawanie odpornych populacji organizmów szkodliwych na stosowane środki chemiczne to jedno z najważniejszych problemów współczesnej ochrony roślin. W wyniku tego zjawiska stosowane dotychczas preparaty tracą efektywność (odporność praktyczna). Istnieje więc potrzeba stałego monitoringu skuteczności dopuszczonych do stosowania substancji czynnych pestycydów, wycofywania nieefektywnych i wprowadzania nowych (o innych mechanizmach działania), aby skutecznie kontrolować zjawisko odporności agrofagów [Zamojska i Malinowski 2012]. Mimo stosowania nowoczesnych technologii w ochronie roślin straty w produkcji roślinnej w skali światowej wywołane obecnością agrofagów nadal osiągają średni poziom 30% [Zamojska i Malinowski 2012]. Stosowanie metod niechemicznych, które są podstawą systemu Integrowanej Ochrony Roślin (IOR), jest niedostatecznie skutecznym działaniem [Stachowiak i in. 2006]. Połączenie, w sposób racjonalny, metod konwencjonalnych z biologicznymi jest najbardziej efektywnym rozwiązaniem w ochronie roślin [Kempka 2014]. Regularna ocena skuteczności substancji czynnych fungicydów jest ważna nie tylko w jej chemicznym aspekcie, ale w wymiarze całego systemu IOR, które Polska, podobnie jak inne kraje UE, wdrożyły od 1 stycznia 2014 r. jako obowiązek ustawy na mocy Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r. i stosownych rozporządzeń krajowych [Dz. U. L 309 z 21.10.2009, Dz. U. 505 z 26.04.2013, Pruszyński 2016, Kopacki i in. 2019].

Celem niniejszych badań była laboratoryjna ocena skuteczności fungicydalnego/fungistatycznego oddziaływania azoksystrobiny (Amistar 250 SC) i difenokonazolu (Score 250 EC) na grzyby fitopatogenne *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* i *Fusarium avenaceum*.

MATERIAŁ I METODY

Badano dwie substancje czynne fungicydów (s.cz.): azoksystrobinę z grupy fungicydów strobilurynowych (s.cz. preparatu Amistar 250 SC; Syngenta Polska Sp. z o. o.) i difenokonazol z grupy fungicydów triazolowych (s.cz. preparatu Score 250 EC; Syngenta

Polska Sp. z o. o.). Każda substancja czynna testowana była w trzech stężeniach: 0,001%; 0,01%; 0,1%, odpowiednio w przeliczeniu na zawartość substancji czynnej w preparacie. Materiałem badawczym były grzyby chorobotwórcze o charakterze polifagicznym, takie jak: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (szczep BL18/21), *Botrytis cinerea* Pers. (szczep B70/20), *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. (szczep P14/20), pochodzące z kolekcji grzybów Katedry Ochrony Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. W badaniu zastosowano metodę zatrutych podłoży, która polega na dodaniu substancji toksycznej do sterylnej podłoża (agar glukozowo-ziemniaczany; PDA, BTL Sp. z o.o.) schłodzonego do temperatury 50°C, a następnie zaszczerpieniu na zestaloną pożywkę badanych gatunków grzybów [Kowalik i Krechniak 1961]. Podłoże wraz z fungicydem rozlewano na sterylne szalki Petriego o średnicy 90 mm, a następnie na zestaloną powierzchnię pożywki centralnie wyszczepiano kolonie grzybów o średnicy 3 mm. Inokulum grzybów pochodziło z 10-dniowych kolonii jednozarodnikowych *A. alternata*, *B. cinerea* i *F. avenaceum* hodowanych na pożywce PDA. Dla każdego badanego stężenia s.cz. fungicydu oraz szczepu grzyba przygotowano po pięć powtórzeń. Kontrolę stanowiły kolonie grzybów *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. avenaceum* rosnące na pożywce PDA bez dodatku s.cz. fungicydu. Tak przygotowane kultury grzybów przechowywano w termostacie przez 8 dni w temperaturze 25°C. Po 2, 4, 6, 8 dniach mierzono średnicę kolonii grzybów (mm). Miarą aktywności antygrzybowej (fungistatycznej/fungicydalnej) było zahamowanie wzrostu grzybni na podłożu z dodatkiem s.cz. fungicydu w stosunku do ich wzrostu na podłożu stanowiącym wariant kontrolny, obliczane na podstawie wzoru Abbota: $I = [(C - T)] \times 100\%$; gdzie: I – wskaźnik zahamowania liniowego wzrostu grzyba (w proc.), C – średnica kolonii grzyba w próbie kontrolnej, T – średnica kolonii grzyba w próbie badawczej zawierającej stężenie badanej s.cz. fungicydu w agarze [Borecki 1984]. Dane analizowano za pomocą analizy wariancji (test Duncana) na poziomie istotności 5% przy użyciu programu statystycznego SAS [SAS wersja 9.1, SAS Inst., Cary, N.C., USA].

WYNIKI

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że testowane substancje czynne fungicydów nie działały fungicydalnie, lecz fungistatyczne w stosunku do grzybów fitopatogennych. Ich działanie zależało od gatunku/szczepu grzyba, rodzaju substancji toksycznej, jej stężenia oraz czasu oddziaływania (tab. 1, fot. 1). Istotne działanie fungistatyczne azoksystrobiny zanotowano względem *A. alternata* i *B. cinerea*, a procent hamowania wzrostu liniowego *A. alternata* względem wariantu kontrolnego wahał się od 39,94% do 56,39% zależnie od stężenia substancji toksycznej w podłożu, podczas gdy dla *B. cinerea* najwyższy stopień hamowania wzrostu kolonii grzyba wynosił 55,31% i 51,40%, odpowiednio dla stężeń 0,01% i 0,1% (ryc. 1, 2, fot. 1). Najlepsze efekty fungistatycznego działania azoksystrobiny uzyskano w pierwszych dniach doświadczenia (4 i 6 dzień). Wraz z upływem czasu działanie antygrzybowe tej substancji malało. Azoksystrobina nie wykazała natomiast żadnego działania fungistatycznego względem *F. avenaceum* (tab. 1, ryc. 3). Difenokonazol bardzo silnie hamował wzrost *A. alternata* i *B. cinerea*, już przy najniższym stężeniu (0,001%) i w pierwszych dniach eksperymentu. Najskuteczniej działał w stężeniu 0,1% względem *A. alternata* (91,11% hamowania w stosunku do wariantu kontrolnego – 10 dzień) i *B. cinerea* (88,07% hamowania względem wariantu kontrolnego – 8 dzień) – ryciny 1, 2. Na podstawie przeprowadzonych

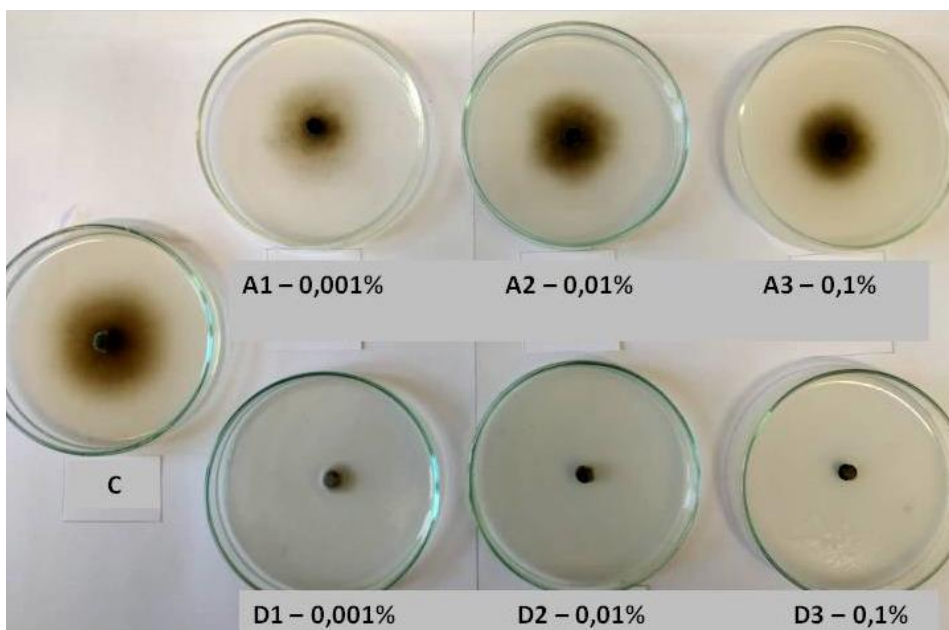
Tabela 1. Wzrost kolonii grzybów na pożywce PDA z dodatkiem różnych stężeń azoksystrobin (A) i difenokonazolu (D)

Table 1. Growth of fungi on PDA medium with the addition of different concentrations of azoxystrobin (A) and difenoconazole (D)

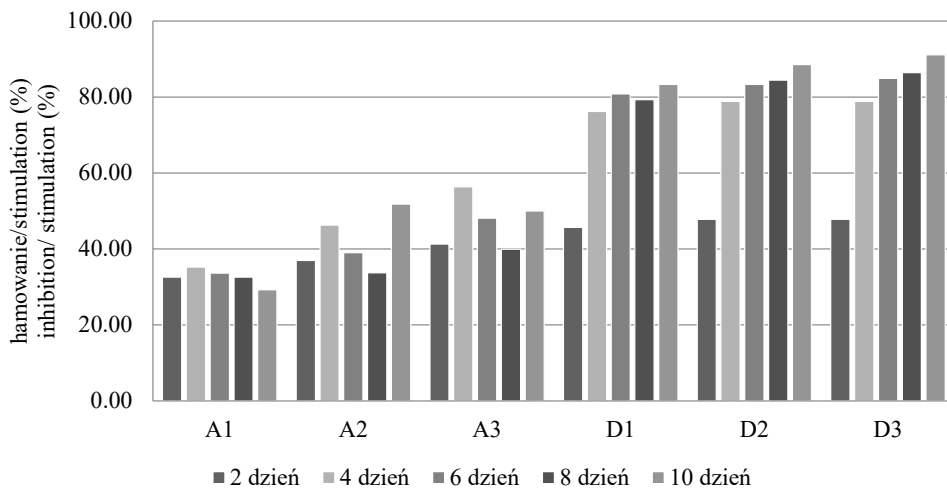
| Gatunek grzyba Fungus species | Średnica kolonii (mm) ±SD Colony diameter (mm) ±SD | | | | | |
|--|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| | | 2. dzień 2 nd day | 4. dzień 4 th day | 6. dzień 6 th day | 8. dzień 8 th day | 10. dzień 10 th day |
| <i>A. alternata</i> (BL18/21) | C | 15,33 ±2,52a* | 37,83 ±3,55a* | 53,00 ±2,00b* | 58,8 ±3,82b* | 90,00 ±0,00a* |
| | A1 | 10,33 ±1,53b | 24,50 ±1,32bc | 35,17 ±2,25de | 39,67 ±2,08de | 63,67 ±2,31b |
| | A2 | 9,67 ±1,1b | 20,33 ±1,04bcde | 32,33 ±2,25de | 39,00 ±1,00de | 43,33 ±2,89d |
| | A3 | 9,00 ±0,00b | 16,50 ±1,32cdefg | 27,5 ±2,50ef | 35,33 ±0,58ef | 45,00 ±0,00cd |
| | D1 | 8,33 ±0,58b | 9,00 ±0,50fgh | 10,17 ±0,58hij | 12,17 ±0,29ijk | 15,00 ±0,00hij |
| | D2 | 8,00 ±0,00b | 8,00 ±0,00gh | 8,83 ±0,76ij | 9,17 ±0,29jk | 10,33 ±2,52ij |
| | D3 | 8,00 ±0,00b | 8,00 ±0,00gh | 8,00 ±0,00j | 8,00 ±0,00k | 8,00 ±0,00j |
| <i>B. cinerea</i> (B70/20) | C | 8,67 ±0,58b* | 29,83 ±8,74ab* | 62,50 ±5,00a* | 69,83 ±4,65a* | 88,33 ±2,89a* |
| | A1 | 8,33 ±0,58b | 18,17 ±1,76cdef | 44,17 ±4,54c | 51,33 ±4,01bc | 66,67 ±2,89b |
| | A2 | 8,00 ±0,00b | 13,33 ±1,44defgh | 38,17 ±5,03cd | 47,83 ±4,25cd | 65,00 ±2,50b |
| | A3 | 8,33 ±0,58b | 14,50 ±0,87cdefgh | 44,67 ±4,04c | 51,00 ±3,61bc | 49,17 ±1,44d |
| | D1 | 8,00 ±0,00b | 5,67 ±1,15h | 19,17 ±1,26fg | 35,17 ±3,33ef | 51,67 ±5,20c |
| | D2 | 7,67 ±0,58b | 7,67 ±0,58gh | 8,33 ±0,58j | 11,67 ±1,76jk | 22,33 ±1,26efgh |
| | D3 | 7,67 ±0,58b | 7,67 ±0,58gh | 8,00 ±0,00j | 8,33 ±0,29 k | 15,00 ±2,50hij |
| <i>F. avenaceum</i> (P14/20) | C | 10,00 ±1,00b* | 10,67 ±0,58efgh* | 15,50 ±1,80ghij* | 17,67 ±1,53hij* | 21,83 ±1,6 fgh* |
| | A1 | 10,00 ±1,73b | 17,33 ±7,51cdefg | 16,57 ±0,51ghi | 21,67 ±2,89gh | 27,83 ±3,69ef |
| | A2 | 9,67 ±1,15b | 14,67 ±1,15defgh | 17,70 ±2,52gh | 21,33 ±0,58ghi | 28,33 ±0,76ef |
| | A3 | 10,00 ±1,73b | 17,00 ±7,94cdefg | 19,83 ±5,03fg | 27,67 ±7,37fg | 31,00 ±7,94e |
| | D1 | 9,00 ±0,00b | 11,00 ±0,00efgh | 13,17 ±0,29ghij | 15,17 ±0,29hijk | 18,67 ±0,76ghi |
| | D2 | 8,67 ±0,58b | 10,33 ±1,15efgh | 12,33 ±0,76ghij | 15,67 ±1,04hijk | 18,50 ±1,50ghi |
| | D3 | 8,00 ±0,00b | 8,00 ±0,00gh | 9,33 ±0,29ij | 12,17 ±2,75ijk | 17,83 ±2,57ghi |

C – wariant kontrolny; A1 – azoksystrobin 0,001%; A2 – azoksystrobin 0,01%; A3 – azoksystrobin 0,1%; D1 – difenokonazol 0,001%; D2 – difenokonazol 0,01% ; D3 – difenokonazol 0,1%; * wartości w kolumnach oznaczone tą samą literą (a, b, c...) nie różnią się istotnie wg testu Duncana dla danego gatunku grzyba na poziomie istotności 5%.

C – control; A1 – azoxystrobin 0.001%; A2 – azoxystrobin 0.01%; A3 – azoxystrobin 0.1%; D1 – difenoconazole 0.001%; D2 – difenoconazole 0.01%; D3 – difenoconazole 0.1%; * values in the columns marked with the same letter (a, b, c...) do not differ significantly for a given fungus species at the significance level of 5%.

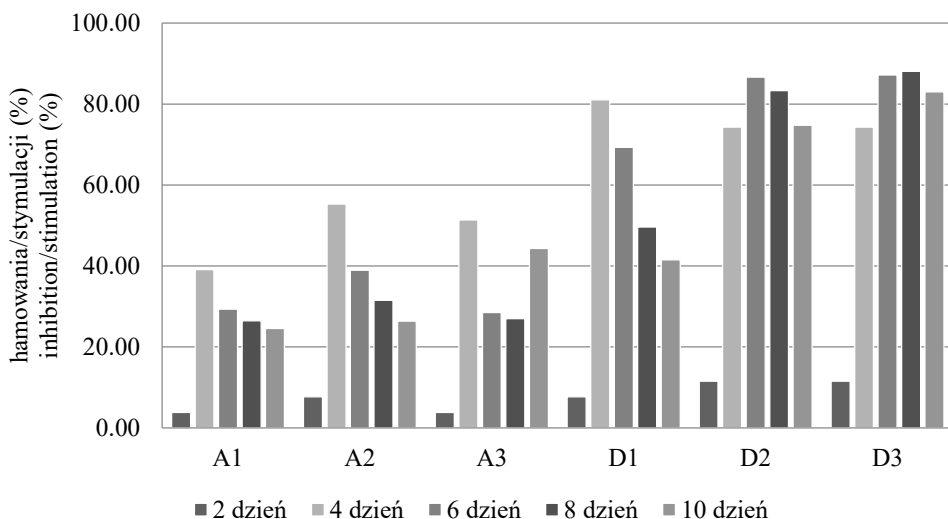


Fot. 1. Wzrost *A. alternata* na pożywce PDA (A – azoksystrobina, D – difenokonazol) – 6. dzień
 Phot. 1. Growth of *A. alternata* on PDA medium (A – azoxystrobin, D – difenoconazole) – 6th day



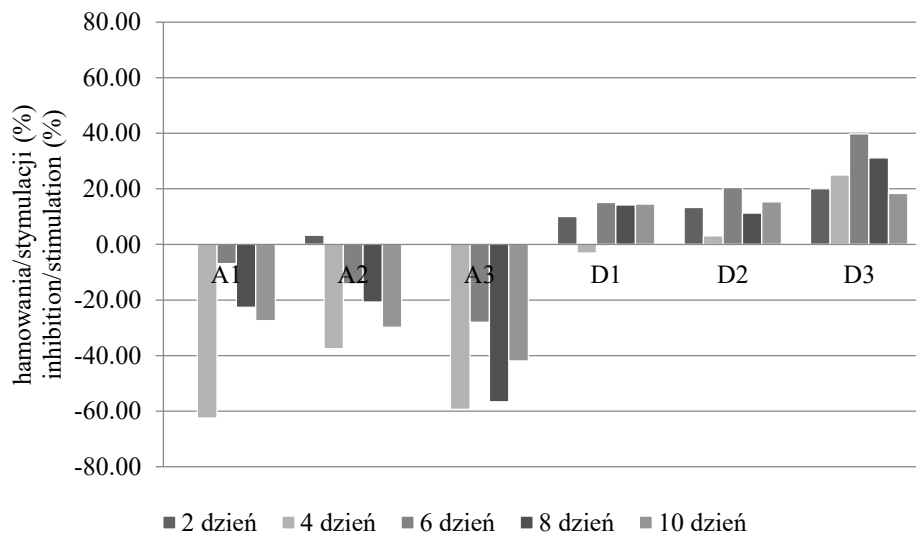
Ryc. 1. Wskaźnik zahamowania/stymulacji wzrostu liniowego *A. alternata* (%) po zastosowaniu azoksystrobiny (A1 – 0,001%; A2 – 0,01%; A3 – 0,1%) i difenokonazolu (D1 – 0,001%; D2 – 0,01%; D3 – 0,1%) względem wariantu kontrolnego

Fig. 1. Linear growth inhibition/stimulation rate of *A. alternata* (%) after the use of azoxystrobin (A1 – 0.001%; A2 – 0.01%; A3 – 0.1%) and difenoconazole (D1 – 0.001%; D2 – 0.01%; D3 – 0.1%), compare to the control



Ryc. 2. Wskaźnik zahamowania/stymulacji wzrostu liniowego *B. cinerea* (%) po zastosowaniu azoksystrobiny (A1 – 0,001%; A2 – 0,01%; A3 – 0,1%) i difenokonazolu (D1 – 0,001%; D2 – 0,01%; D3 – 0,1%) względem wariantu kontrolnego

Fig. 2. Linear growth inhibition/stimulation rate of *B. cinerea* (%) after the use of azoxystrobin (A1 – 0.001%; A2 – 0.01%; A3 – 0.1%) and difenoconazole (D1 – 0.001%; D2 – 0.01%; D3 – 0.1%), compare to the control



Ryc. 3. Wskaźnik zahamowania/stymulacji wzrostu liniowego *F. avenaceum* (%) po zastosowaniu azoksystrobiny (A1 – 0,001%; A2 – 0,01%; A3 – 0,1%) i difenokonazolu (D1 – 0,001%; D2 – 0,01%; D3 – 0,1%) względem wariantu kontrolnego

Fig. 3. Linear growth inhibition/stimulation rate of *F. avenaceum* (%) after the use of azoxystrobin (A1 – 0.001%; A2 – 0.01%; A3 – 0.1%) and difenoconazole (D1 – 0.001%; D2 – 0.01%; D3 – 0.1%), compare to the control

badan stwierdzono, że spośród badanych gatunków grzybów najmniej wrażliwy na difenokonazol okazał się gatunek *F. avenaceum* (tab. 1). Odzwierciedlają to wyliczone współczynniki zahamowania wzrostu grzyba (dla wszystkich badanych stężeń), które nie różnią się istotnie od wariantu kontrolnego (ryc. 3). Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na uzasadnione wątpliwości co do skuteczności stosowania azoksystrobiny (fungicyd Amistar 250 SC) w ochronie roślin przed *F. avenaceum*. Difenokonazol powinien być nadal zalecany i stosowany w ochronie roślin przed alternariozą i szarą pleśnią, natomiast nie powinien być stosowany do zwalczania *F. avenaceum*.

DYSKUSJA

Brak skutecznego działania fungicydów i związane z tym zjawisko odporności grzybów na substancje toksyczne są coraz częściej dyskutowane w gronie wielu specjalistów [Deising i in. 2008, Zamojska i Malinowski 2012, Pieczul 2015, Wachowska i in. 2017, Yang i in. 2019]. Zjawisko odporności w świecie mikroorganizmów jest procesem powstającym pod wpływem długotrwałe, powtarzalnie działającego czynnika presji selekcyjnej i jest naturalną konsekwencją zachodzących nieprzerwanie procesów ewolucyjnych [Nowaczyk i Obrępańska-Stęplowska 2006]. Przeprowadzone badania wykazały zróżnicowaną skuteczność azoksystrobiny i difenokonazolu, zależną od gatunku grzyba, rodzaju i stężenia substancji toksycznej. Wyniki testów laboratoryjnych wykazały fungistatyczne działanie azoksystrobiny względem *A. alternata* i *B. cinerea* dla wszystkich badanych stężeń. Odmienne wyniki uzyskały Stępniewska-Jarosz i Kierzek [2018], wskazując na wysoką skuteczność azoksystrobiny względem *Alternaria* spp., w tym *A. alternata*. Bardziej obiecujące wyniki uzyskano po zastosowaniu difenokonazolu, lecz również tylko względem *A. alternata* i *B. cinerea*. Już najniższe stężenie difenokonazolu w podłożu (0,001%) istotnie hamowało wzrost tych grzybów, a efektywność fungistatycznego działania względem *B. cinerea* utrzymywała się na wysokim poziomie przez cały czas eksperymentu. Najwyższą skuteczność difenokonazolu wykazano względem *A. alternata* i *B. cinerea* 8. i 10. dnia eksperymentu przy stężeniach 0,01% i 0,1%. Niskie ryzyko rozwoju oporności *A. alternata* na difenokonazol potwierdził He i współautorzy [2019]. Podobnie Wang i współautorzy [2016] w swoich badaniach wskazali na wyższą wrażliwość *A. alternata* na difenokonazol niż na azoksystrobinę. Przeprowadzone badania wykazały natomiast wysoką oporność szczepu *F. avenaceum* P14/20 na azoksystrobinę i niewielką jego wrażliwość na difenokonazol. Merlington [2014] w swoich badaniach potwierdza niewrażliwość *Fusarium* spp. na azoksystrobinę i difenokonazol. Inni autorzy [Danielewicz i in. 2013, Stępniewska-Jarosz i in. 2017] wskazują na skuteczność azoksystrobiny względem *F. avenaceum*, ale stosowanej w mieszaninie z tiofanatem metylowym lub tiofanatem metylowym i tebukonazolem.

Wrażliwość/oporność organizmu na substancję toksyczną decyduje o tzw. odporności praktycznej, która definiowana jest jako brak efektywności działania pestycydu w warunkach polowych [Reuveni i Sheglov 2002, Nowaczyk i Obrępańska-Stęplowska 2006]. U patogenów odznaczających się dużą zmiennością genetyczną, krótkim cyklem rozwojowym, obfitym zarodnikowaniem występuje wyższe ryzyko powstawania odporności [Deising i in. 2008]. Do takich mikroorganizmów należą *A. alternata*, *B. cinerea* i *Fusarium* spp. Są to grzyby kosmopolityczne występujące na różnych gatunkach roślin [Rataj-Guranowska 2012, Stępniewska-Jarosz 2012, Stępniewska-Jarosz i Rataj-Guranowska 2012, Wolny-Koładka 2014]. Charakteryzują się wysokim zróżnicowaniem fenotypowym, wy-

soką liczbą pokoleń w sezonie wegetacyjnym i obfitym zarodnikowaniem (wysoki potencjał rozrodczy). W każdej populacji, obok dominujących form wrażliwych, mogą w wyniku mutacji, krzyżowania i heterokariozy (u grzybów) pojawić się osobniki odporne. Formy te, początkowo nieliczne, wskutek selekcyjnego działania pestycydu, stopniowo zaczynają dominować w populacji [Nowaczyk i Obrępańska-Stęplowska 2006]. Odporność patogenu na fungicydy za sprawą mutacji genowych rozwija się łatwo i szybko [Hua i in. 2018]. Odsetek izolatów opornych na badane fungicydy m.in. azoksystrobinę i difenokonazol w badaniach przeprowadzonych przez Maia i współautorów [2021] wynosił nawet ponad 43%.

Uodpornianie się patogenów zależy nie tylko od czynników wewnętrznych związanych z cechami agrofaga, ale również od właściwości substancji toksycznej i jej mechanizmu działania [Deising i in. 2008.] Pestycydy działające na kilka układów enzymatycznych jednocześnie stwarzają mniejsze niebezpieczeństwo uodpornienia się osobnika niż związki selektywne, działające na ściśle określone funkcje [Nowaczyk i Obrępańska-Stęplowska 2006]. Do pestycydów wysokiego ryzyka odporności, ze względu na jednokierunkowy mechanizm działania, należy zaliczyć strobiluryny i fenyloamidy [Pieczul 2015]. Wykazano, że azoksystrobina należąca do analogów strobiluryny wykazywała słabe działanie fungistatyczne lub jego brak m.in. ze względu na jednostronny mechanizm działania. Ta substancja czynna fungicydu po raz pierwszy została zarejestrowana w Polsce w 1997 r. [Sobczak i Matyjaszczyk 2016]. Jako fungicyd strobilurynowy stosowana jest już ponad 20 lat na szerokie spektrum patogenów. Podobnie difenokonazol zarejestrowano w Polsce w 1998 roku jako substancję o szerokim spektrum działania [Sobczak i Matyjaszczyk 2016]. Należy on do grupy fungicydów triazolowych o jednostronnym mechanizmie działania (IBE – Inhibitory Biosyntezy Ergosterolu) [Shen i in. 2022]. Ww. substancje czynne są bardzo często stosowane przez producentów rolnych, czego potwierdzeniem są wyniki badań przeprowadzone przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) i IOR-PIB Poznań. Według EFSA najczęściej wykrywanymi pozostałościami w 2018 r. była m.in. azoksystrobina, a według IOR – PIB w 2018 i 2019 r. m.in. difenokonazol [Jankowska i Łozowicka 2021]. Długotrwała obecność ww. substancji czynnych na rynku agrochemikaliów oraz wysoka częstotliwość ich stosowania względem grzybów patogennych z różnych grup taksonomicznych, przyczyniają się do spadku ich fungistatycznego działania, co również wykazano w badaniach własnych.

Ewolucja odporności patogenów na fungicydy jest jednym z głównych problemów w zrównoważonym zarządzaniu chorobami roślin [He i in. 2019]. Warto zaznaczyć, że pomimo iż omawiane substancje czynne są zarejestrowane jako pojedyncze fungicydy, są również łączone w gotowe mieszaniny, np. azoksystrobina + difenokonazol, co zwiększa siłę ich grzybobójczego działania [Baggio i in. 2018]. Regularna ocena skuteczności fungistatycznego/fungicydalnego działania substancji czynnych fungicydów, podjęcie działań zmierzających do rejestracji nowych środków grzybobójczych oraz stosowanie zintegrowanych metod ochrony roślin są działaniami, które pozwalają skutecznie kontrolować zjawisko odporności patogenów na pestycydy [Maia i in. 2021].

WNIOSKI

1. Difenokonazol, substancja czynna fungicydu Score 250 EC, wykazywał wysoką aktywność fungistatyczną w warunkach laboratoryjnych względem *Alternaria alternata*

i *Botrytis cinerea*, natomiast niską aktywność antygrzybową względem *Fusarium avenaceum* niezależnie od testowanego stężenia.

2. Azoksystrobina, substancja czynna fungicydu Amistar 250 S.C., w niewielkim stopniu hamowała wzrost *A. alternata* i *B. cinerea* w warunkach *in vitro*, natomiast nie hamowała rozrostu powierzchniowego *F. avenaceum*.

PIŚMIENNICTWO

- Baggio J.S., Peres N.A., Amorim L., 2018. Sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates from conventional and organic strawberry fields in Brazil to azoxystrobin, iprodione, pyrimethanil, and thiophanate-methyl. *Plant Dis.* 102(9), 1803–1810.
- Borecki Z., 1984. Fungicydy stosowane w ochronie roślin. PWN, Warszawa.
- Danielewicz B., Gwiazdowski R., Bednarek-Bartsch A., 2013. Influence of some selected fungicides on *Fusarium* genus cultures growth limitation. *Prog. Plant Prot.* 53(4), 759–761.
- Deising H.B., Reimann S., Pascholati S.F., 2008. Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Braz. J. Microbiol.* 39(2), 286–295. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220080002000017>
- Dz.U. 2013 poz. 505. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 kwietnia 2013 r. w sprawie wymagań integrowanej ochrony roślin.
- Dz.U. L 309 z 21.10.2009. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE z dnia 21.10.2009 ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów.
- He M.H., Wang Y.P., Wu E.J., Shen L.L., Yang L.N., Wang T., Shang L.P., Zhu W., Zhan J., 2019. Constraining evolution of *Alternaria alternata* resistance to a demethylation inhibitor (DMI) fungicide difenoconazole. *Front. Microbiol.* 10, 1609. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01609>
- Hua L., Yong C., Zhanquan Z., Boqiang L., Guozheng Q., Shiping T., 2018. Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Qual. Saf.* 2(3), 111–119. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>
- Jankowska M., Łozowicka B., 2021. Naturalne i syntetyczne substancje toksyczne występujące w roślinach rolniczych i ich produktach. *Prog. Plant Prot.* 61(1), 24–30. <https://doi.org/10.14199/ppp-2021-003>
- Kempka J., 2014. Biologiczna ochrona roślin przed chorobami jako element integrowanej ochrony roślin. Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie, Kraków.
- Komunikat MRiRW, 2022. Nowe terminy na sprzedaż i stosownie środków ochrony roślin. <https://www.gov.pl/web/rolnictwo/komunikat---nowe-terminy-na-sprzedaz-i-stosowanie-srodkow> [dostęp: 22.06.2022].
- Kopacki M., Stępiak P.M., Jamiołkowska A., Skwaryło-Bednarz B., Krzepiło A., 2019. Integrowana ochrona roślin jako element dobrej praktyki rolniczej. *Aura* 2, 12–14. <http://dx.doi.org/10.15199/2.2019.2.3>
- Kowalik R., Krechniak E., 1961. Szczegółowa metodyka biologicznych laboratoryjnych badań środków grzybobójczych. W: W. Węgorzek (red.), Materiały do metodyki biologicznej oceny środków ochrony roślin. Wyd. Instytut Ochrony Roślin, Poznań, 63–66.
- Maia J.N., Beger G., Pereira W.V., De Mío L.L.M., Duarte H.D.S.S., 2021. Gray mold in strawberries in the Paraná state of Brazil is caused by *Botrytis cinerea* and its isolates exhibit multiple-fungicide resistance. *Crop Prot.* 140, 105415. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105415>
- Montanarella L., Panagos P., 2021. The relevance of sustainable soil management within the European Green Deal. *Land Use Policy* 100, 104950. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2020.104950>
- Nowaczyk K., Obrępańska-Stęplowska A., 2006. Wybrane mechanizmy nabywania odporności organizmów na środki ochrony roślin. *Postępy Biol. Komórki* 33(1), 137–158.
- Pieczul K., 2015. Przyczyny odporności na fungicydy grzybów patogenicznych dla roślin. *Zag. Doradz. Rol.* 1, 83–93.

- Pralińska M., Jaśkiewicz J., Rackiewicz I., 2020. Wyzwania dla rolnictwa związane ze strategią Europejski Zielony Ład w okresie pandemii. Zesz. Nauk. Szk. Gł. Gospod. Wiej. Warsz., Probl. Rol. Światowego 20(2), 22–36. <https://doi.org/10.22630/PRS.2020.20.2.10>
- Pruszyński S., 2016. Metoda biologiczna. W: S. Pruszyński. (red.), Metody ochrony w integrowanej ochronie roślin, Wyd. Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie, Poznań, 21–26.
- Rataj-Guranowska M., 2012. *Botrytis cinerea* Pers. W: M. Rataj-Guranowska, A. Pukacka (red.), Kompendium symptomów chorób roślin i morfologii ich sprawców. Bogucki Wydawnictwo Naukowe, Poznań, 38–41.
- Reuveni M., Sheglov D., 2002. Effects of azoxystrobin, difenoconazole, polyoxin B (polar) and trifloxystrobin on germination and growth of *Alternaria alternata* and decay in red delicious apple fruit. Crop Prot. 21(10), 951–955.
- Shen C., Pan X., Wu X., Xu J., Dong F., Zheng Y., 2022. Ecological risk assessment for difenoconazole in aquatic ecosystems using a web-based interspecies correlation estimation (ICE)-species sensitivity distribution (SSD) model. Chemosphere 289, 133236. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133236>
- Sobczak J., Matyjaszczyk E., 2016. Porównanie kosztów chemicznej ochrony roślin z udziałem środków zawierających stare i nowe substancje aktywne. Roczn. Nauk. Stow. Ekon. Rol. Agrobiz. 18(2), 245–248.
- Stachowiak B., Czarniecki Z., Trojanowska K., Gulewicz K., 2006. Komposty i możliwość ich wykorzystania w biologicznej ochronie roślin. J. Res. Appl. Agric. Eng. 51(2), 171–177.
- Stępniewska-Jarosz S., Kierzek R., 2018. Fungi colonizing linseed plants (*Linum usitatissimum* L. var. *brevimulticaulis* Vav.) and efficacy of some fungicides against this plant diseases. Prog. Plant Prot. 58(4), 314–320.
- Stępniewska-Jarosz S., Kierzek R., Wojczyńska J., Sadowska K., Tyrakowska M., Łukaszewska-Skrzypniak N., Rataj-Guranowska M., 2017. Grzyby zasiedlające rośliny facelii błękitnej (*Phacelia tanacetifolia* Benth.) po zabiegach fungicydowych. Prog. Plant Prot. 57(4), 239–244. <https://doi.org/10.14199/ppp-2017-036>
- Stępniewska-Jarosz S., Rataj-Guranowska M., 2012. *Alternaria alternata* (Fr.) Keiss. W: M. Rataj-Guranowska, A. Pukacka (red.), Kompendium symptomów chorób roślin i morfologii ich sprawców. Bogucki Wydawnictwo Naukowe, Poznań, 7–11.
- Wachowska U., Goriewa K., Duba A., 2017. Charakterystyka grup fungicydów i induktorów odporności stosowanych w ograniczaniu występowania patogenów zbóż. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 589.
- Wang H., Huang Y., Wang J., Chen X., Wei K., Wang M., Shang S., 2016. Activities of azoxystrobin and difenoconazole against *Alternaria alternata* and their control efficacy. Crop Prot. 90, 54–58.
- Wolny-Koładka K., 2014. Grzyby z rodzaju *Fusarium* - występowanie, charakterystyka i znaczenie w środowisku. Kosmos 63(4), 623–633.
- Wrzaszcz W., Prandecki K., 2020. Rolnictwo a Europejski Zielony Ład. Zag. Ekon. Rol. 365(4), 156–179.
- Yang L.N., He M.H., Ouyang H.B., Zhu W., Pan Z.C., Sui Q.J., Shang L.P., Zhan J., 2019. Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. BMC Microbiology 19, 205. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1574-8>
- Zamojska J., Malinowski H., 2012. Integrated plant protection and pest resistance to pesticide in Poland. Prog. Plant Prot. 52(4), 1–5.

Źródło finansowania: Badania zostały sfinansowane przez Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie (projekt OKK/s/44/2023).

Summary. The aim of this study was to evaluate laboratory effectiveness of the fungicidal effect of azoxystrobin (Amistar 250 SC) and difenoconazole (Score 250 EC) on selected phytopathogenic fungi (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium avenaceum*). The poison plate method was used in the study. The effect of azoxystrobin and difenoconazole on the growth of fungi depended on the species of fungus and the dose of toxic ingredient in the medium. The tested active ingredients did not show a fungicidal effect, but a fungistatic effect, most effective at higher concentrations, ie 0.01% and 0.1%. Difenoconazole was more effective against fungi than azoxystrobin. Both active ingredients inhibited the growth of *A. alternata* and *B. cinerea* from 3.85% to 88.07%, depending on the concentration of active ingredient and duration of action. Azoxystrobin at all tested concentrations did not inhibit *F. avenaceum* mycelium growth, while difenoconazole in the tested concentrations showed a weak fungistatic activity against *F. avenaceum*. The highest degree of growth inhibition of *F. avenaceum* noted for 0.1% difenoconazole concentration was 39.75%.

Key words: pathogenic fungi, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium avenaceum*, azoxystrobin, difenoconazole

Otrzymano/Received: 24.08.2022
Zaakceptowano/Accepted: 20.12.2022

