

**UTJECAJ HERBICIDA NA RAST SOJEVA KVRŽIČNIH
BAKTERIJA KOJE NODULIRAJU GRAŠAK
(*Pisum sativum* L.)**

THE INFLUENCE OF HERBICIDES ON GROWTH OF PEA
(*Pisum sativum* L.) NODULATING RHIZOBIAL STRAINS

**Mihaela Blažinkov, Ana Šnajdar, Klara Barić, Sanja Sikora, Ivana
Rajnović, S. Redžepović**

SAŽETAK

Simbiotska fiksacija dušika kod uzgoja mahunarki nastoji se što više koristiti u održivoj poljoprivrednoj proizvodnji. Jedna od značajnijih krmnih mahunarki je stočni ili krmni grašak (*Pisum sativum* L.). U zajednici s kvržičnim bakterijama vrste *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* i *Rizobium pisi*, stočni grašak osigurava znatno korištenje atmosferskog dušika, inače ograničavajućeg čimbenika u intenzivnoj poljoprivrednoj proizvodnji. U svrhu veće iskoristivosti procesa biološke fiksacije dušika provodi se predstjetvena bakterizacija sjemena graška. Pretpostavlja se da uporaba herbicida predstavlja potencijalnu opasnost za aktivnost kvržičnih bakterija u tlu, zbog čega je potrebno istražiti njihov utjecaj na rast i razvoj kvržičnih bakterija. Cilj istraživanja je utvrditi utjecaj različitih koncentracija herbicida imazamoksa, pendimetalina i klomazona na rast deset sojeva vrste *R. leguminosarum* sv. *viciae* i *R.pisi*. Utvrđen je značajan utjecaj visokih doza herbicida klomazona na većinu ispitivanih sojeva. Inhibirao je rast sojeva *R. l.* sv. *viciae* 1001, Kž 16 i *R.pisi* 30132, a usporio rast sojeva Kž 23 i Kž 24. Inhibitorski učinak klomazona utvrđen je samo primjenom najviše istraživane koncentracije (10.000 ppm). Negativan učinak imazamoksa i pendimetalina na rast ispitivanih sojeva nije utvrđen.

Glavne riječi: biološka fiksacija dušika, sojevi *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, herbicidi

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation in legume cultivation has an important role in sustainable agriculture production. An important forage legume is the field pea (*Pisum sativum* L.). Together with nitrogen-fixing bacteria *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* and *Rhizobium pisi*, field peas provide use of abundant amounts of atmospheric nitrogen, the limiting factor in agricultural production.

In order to increase the utilization of biological nitrogen fixation, the inoculation of forage pea seeds is recommended. It is assumed that herbicide treatment poses a potential threat to the activity of symbiotic fixing bacteria in the soil, so it is necessary to determine their impact on the growth of nitrogen-fixing bacteria. The aim of the study is to analyse the effects of different concentrations of herbicides imazamox, pendimethalin and clomazone on growth of ten *R. leguminosarum* sv. *viciae* and *R. pisi* strains. The results reveal a significant effect of herbicide clomazone on the majority of tested strains, because it inhibited growth of strains *R. leguminosarum* sv. *viciae* 1001, Kž 16 and *R. pisi* 30132 and decreased growth of strains Kž 23 i Kž 24. The inhibitory effect of clomazone on strain growth was determined only at the highest herbicide concentration (10 000 ppm). The negative effect of imazamox and pendimethalin on the growth of tested strains has not been determined.

Key words: biological nitrogen fixation, *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* strains, herbicides

UVOD

Simbiozni odnos mahunarki i kvržičnih bakterija ima jedinstvenu ulogu u održivoj poljoprivredi te se nastoji sve više primjenjivati putem predstetvene bakterizacije leguminoza (Sikora i sur. 2008). Procesom biološke fiksacije atmosferskog dušika, bakterije osiguravaju mahunarkama dovoljne količine dušičnog hranjiva. Jedna od značajnijih krmnih mahunarki je stočni ili krmni grašak čija važnost se ogleda u prilagodljivosti na različite uvjete, brojnosti kultivara i velikim mogućnostima korištenja u stočarskoj proizvodnji (Štafa, 1997). Osim navedenog, stočni grašak u simbioznom odnosu s kvržičnim bakterijama vrsti *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* i *R. pisi* (Ramirez-Bahena i sur. 2008) može ostvariti značajne prinose bez potrebe korištenja mineralnih dušičnih gnojiva (Faulkner, 1985; Blažinkov i sur., 2007). Međutim,

bilo koji negativan utjecaj na kvržične bakterije rezultira smanjenjem učinka biološke fiksacije dušika, a posljedično i smanjenjem prinosa usjeva. Svaka uzgajana kultura pa tako i stočni grašak ima svoje pratioce, odnosno vrste korova koji su važni kompetitori za svjetlo, vodu, hraniva i prostor (Goršić i Barić, 2009.). Zbog toga je u tehnologiji uzgoja graška primjena herbicida redovita mjera. Primjenjuju se nakon sjetve a prije nicanja ili neposredno nakon nicanja, zbog čega se zadržavaju u plitkom površinskom sloju tla. Stoga se opravdano postavlja pitanje njihovog utjecaja na preživljavanje i metaboličku aktivnost korisnih mikroorganizama u tlu (Redžepović, 1981; Somerville i Greaves, 1987; Locke i Zablutowicz, 2004.; Ahemad i Khan, 2010. Foldeny i sur. 2011). U radovima se navode različiti utjecaji herbicida na rast i aktivnost mikroorganizama u tlu što prvenstveno ovisi o vrsti herbicida i vrsti mikroorganizama kao i perzistentnosti herbicida (Cvijanović i sur. 2006.).

Obzirom da herbicidi predstavljaju sastavni dio tehnologije uzgoja poljoprivrednih kultura, postavlja se pitanje njihovog utjecaja na simbiozne fiksatore dušika, odnosno, na zastupljenost i vijabilnost sojeva kvržičnih bakterija u tlu. Na osnovi raznih istraživanja, utvrđeno je da primjena herbicida u bakteriziranom usjevu mahunarki može utjecati na rast bakterija, indirektno kroz utjecaj na biljku domaćina i kroz utjecaj na njihov simbiozni odnos (Gonzales i sur., 1996; Milošević i sur., 2006; Hungria i sur., 2014). U pogledu utjecaja na simbiozni odnos Abd-Alla i Omar (1993) navode kako je primjena herbicida u bakteriziranom usjevu boba negativno utjecala na nodulaciju, sadržaj dušika u korijenu i biljci, sadržaj leghemoglobina i ugljikohidrata kao i na pojedine strukture unutar bakterioida. Ispitivanje utjecaja herbicida na simbiozne fiksatore može se obavljati kroz simbiozni odnos s biljkom domaćinom ili izravnim utjecajem na rast sojeva. Singh i Wright (1999) su utvrdili da herbicidi različito utječu na nodulaciju, nitrogenaznu aktivnost i rast graška. Isti autori (2002) su istraživali djelovanje herbicida terbutrina, simazina, prometrina i bentazona na kvržične bakterije *Rhizobium leguminosarum*. Utvrdili su izravan inhibitoran učinak terbutrina na rast rizobija te da povećanje koncentracija ovog herbicida umanjuje njihovu funkciju. Simazin i prometrin su pokazali inhibitorno djelovanje samo pri primjeni visokih koncentracija, dok bentazon nije pokazao nikakve negativne učinke.

Poznato je da se sojevi kvržičnih bakterija međusobno značajno razlikuju u simbioznoj učinkovitosti, kompetitivnosti, ali i u otpornosti na nepovoljne uvjete u tlu (pH, vlaga, temperatura, salinitet, herbicidi, teški metali, i dr.). Međutim, osim simbiozne učinkovitosti, pojedini sojevi imaju sposobnost

razgradnje pesticida u netoksične oblike, odnosno, mogu ih koristiti kao izvor biogenih elemenata i energije za svoje fiziološke procese (Shivaramaiah i Kennedy, 2006). Zbog toga je kod proizvodnje cjepiva za predstjetvenu bakterizaciju potrebno izabrati visokoučinkovite sojeve koji su istovremeno manje osjetljivi na negativno djelovanje herbicida.

Cilj ovih istraživanja je ispitati utjecaj različitih koncentracija herbicida koji se primjenjuju za tretiranje korova u stočnom grašku na rast sojeva vrste *R. leguminosarum* sv. *viciae* i *R. pisi*.

METODE ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je provedeno s deset sojeva *R. leguminosarum* sv. *viciae* iz kolekcije sojeva Zavoda za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sedam autohtonih sojeva (oznaka sojeva: 157, Kž 16, Kž 17, Kž 18, Kž 22, Kž 23, Kž 24) izolirano je iz različitih tala na području sjeverozapadne Hrvatske. Sojevi su genetički karakterizirani, a procijenjena je i njihova simbiotska učinkovitost u vegetacijskom pokusu (Blažinkov, 2006). Referentni sojevi, uključeni u istraživanje, dobiveni su iz Institute of Grassland & Environmental Research – Dyfed (Velika Britanija) i to sojevi *R. l.* sv. *viciae* 1001 i 1045 te soj *R. pisi* 30132 iz Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellenkulturen GmbH (Njemačka). Sojevi su uzgajani na YMA podlozi (Vincent, 1970). Korištena su tri herbicida koji se primjenjuju u suzbijanju jednogodišnjih i višegodišnjih širokolisnih korova u usjevima mahunarki (Barić i Ostojić, 2011). Ispitivan je utjecaj herbicida imazamoks, pendimetalin i klomazon u četiri koncentracije (10 ppm, 100 ppm, 1.000 ppm i 10.000 ppm). Imazamoks je sistemski, zemljišni, post-em herbicid iz skupine imidazolinona. Klomazon je selektivni, zemljišni, pre-em herbicid iz skupine izoksazolidinona, a pendimetalin je selektivni, zemljišni, pre-sow i pre-em herbicid iz grupe dinitroanilina (N.N., 2007). Ispitivanje utjecaja herbicida na sojeve kvržičnih bakterija provedeno je pomoću filter-disk metode, opisane u radu Blažinkov i sur. (2010). Utvrđivanje učinka herbicida obavljeno je šest dana nakon inkubacije tako da su izmjerene zone inhibicije oko diskova koji sadrže različite koncentracije herbicidnih pripravaka. Sva ispitivanja izvršena su u tri ponavljanja.

REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati istraživanja odnose se na najveću korištenu koncentraciju herbicida (10.000 ppm), jer pri ostalim koncentracijama nije bilo zona inhibicije. Rezultati istraživanja prikazani su na tablici 1.

Tablica 1: Utjecaj koncentracije herbicida (10 000 ppm) na rast sojeva kvržičnih bakterija koje noduliraju grašak

Table 1: The effect of herbicide concentration (10 000 ppm) on growth of rhizobial strains nodulating pea

| Soj <i>Strain</i> | Herbicid <i>Herbicide</i> | | |
|----------------------|------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| | Imazamoks <i>Imazamox</i> | Pendimetalin <i>Pendimethalin</i> | Klomazon <i>Clomazone</i> |
| 1001 | 0 | 0 | 2-3i |
| 1045 | ++ | 0 | 0 |
| 30132 | 0 | 0 | 2 i |
| 157 ₂ | ++ | ++ | 0 |
| Kž 16 | 0 | 0 | 3 i |
| Kž 17 | ++ | 0 | 0 |
| Kž 18 | ++ | ++ | 0 |
| Kž 22 | ++ | 0 | 0 |
| Kž 23 | 0 | 2i* | 2i* |
| Kž 24 | 0 | 0 | 2i* |

i = zona inhibicije rasta sojeva (mm)
i* = sporiji rast sojeva (mm)
++ = pojačan rast sojeva oko diskova
0 = nema inhibicije rasta

i= inhibition zone of strain growth (mm)
i*= weak growth of strain (mm)
++ = increased growth of strain
0= no inhibition zone

Utvrđeno je da istraživani herbicidi različito utječu na rast pojedinih sojeva. Također je utvrđeno da se i sojevi međusobno razlikuju u reakciji na pojedini herbicid. Herbicid imazamoks je potaknuo rast svih sojeva kvržičnih bakterija korištenih u istraživanju, odnosno imao je stimulativni učinak obzirom na utvrđen pojačan ili čak isključiv rast oko diskova.

Slični rezultati su dobiveni u radu Blažinkov i sur. (2010) gdje je ispitivan utjecaj navedenog herbicida na rast različitih sojeva *Sinorhizobium meliloti*.

Istraživanjem je utvrđen dobar rast većine sojeva na svim koncentracijama imazamoksa.

Približno isti rezultati utvrđeni su i kod herbicida pendimetalina. Herbicid pendimetalin je imao stimulatивно djelovanje na rast sojeva 157 i Kž 18, što je vidljivo iz izrazito pojačanog rasta sojeva oko diska s najvećom koncentracijom navedenog herbicida. Može se zaključiti da bi se primjenom ovih herbicida u praksi nesmetano odvijala biološka fiksacija dušika, te se mogu preporučiti za tretiranje usjeva stočnog graška prethodno bakteriziranog s visoko učinkovitim sojevima *R. l. sv. viciae*.

Herbicid klomazon je negativno utjecao na rast pojedinih sojeva i to samo pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji (1.000 ppm). Niže koncentracije nisu imale negativnog učinka. Veličina zone inhibicije ovisila je o osjetljivosti soja. Najveću osjetljivost na klomazon pokazali su referentni soj *R. l. sv. viciae* 1001, tipski soj *R. pisi* 30132 i autohtoni soj Kž 16. Autohtoni sojevi Kž 23 i Kž 24 osjetljivost na herbicid klomazon su iskazali kroz sporiji i manje bujan rast, međutim, bez zone potpune inhibicije.

Najbolju tolerantnost na sva tri korištena herbicida iskazali su autohtoni sojevi 1572, Kž 17, Kž 18 i Kž 22 te referentni soj 1045 na čiji rast i razvoj herbicidi nisu imali negativne učinke.

ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem utvrđene su razlike u djelovanju pojedinih herbicida na rast sojeva kvržičnih bakterija koje noduliraju grašak. Utvrđeno je i da su na isti herbicid sojevi različito tolerantni. Herbicid imazamoks je imao stimulativan učinak na rast istraživanih sojeva. Pendimetalin nije imao negativan utjecaj na rast istraživanih sojeva, a na sojeve 1572 i Kž18 je djelovao stimulatивно.

Klomazon je u najvećoj koncentraciji inhibirao rast sojeva 1001, 30132 i Kž 16. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da bi istraživanje trebalo usmjeriti u pravcu provjere istih u vegetacijskom i poljskom pokusu pri čemu bi se ispitivao utjecaj herbicida na nodulacijsku sposobnost sojeva kao i na njihovu simbioznu učinkovitost.

LITERATURA

1. Abd-Alla, M.H., Omar, S.A. (1993.): Herbicides effects on nodulation, growth and nitrogen yield of faba bean induced by indigenous *Rhizobium leguminosarum*. Zentralbl. Microbiol. 148: 593-597.
2. Ahemad, M., Khan, M.S. (2010.): Ameliorative effects of *Mesorhizobium sp.*MRC4 on chickpea yield and yield components under different doses of herbicide stress. Pesticide Biochemistry and Physiology 98: 183-190.
3. Barić, K., Ostojić, Z. (2011): Herbicidi. Pregled sredstava za zaštitu bilja u Hrvatskoj. Glasilo biljne zaštite 1-2: 73-111.
4. Blažinkov, M. (2006.): Gentička raznolikost prirodnih populacija *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* u tlima ekološkog područja sjeverozapadne Hrvatske. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.
5. Blažinkov, M., Sikora, S., Uher, D., Maćešić, D., Redžepović, S. (2007.): Genopypic characterisation of Indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Field Population in Croatia. Agriculturae Conspectus Scientificus 72: (2): 153-158.
6. Blažinkov, M., Sudarević, I., Barić, K., Sikora, S., Čolo, J., Redžepović, S. (2010.): Utjecaj različitih herbicida na rast autohtonih i referentnih sojeva *Sinorhizobium meliloti*. XXI Naučno-stručna konferencija poljoprivrede i prehrambene industrije, Zbornik radova. 1: 123-129.
7. Cvijanović, G., Milošević, N., Đalović, I., Lalević, B. (2006.): The dynamics of soil microorganisms related to the applied herbicides. Herbologia 7, (2): 49-56.
8. Faulkner, J.S., (1985.): A comparison of faba beans and peas as whole-crop forages. Grass and Forage Science 50: 249-258.
9. Foldenyi R., Czinkota I., Tolner L. (2011.): Pesticide soil interaction. Pesticide in the Modern World: 440 – 460
10. Gonzalez, A., Gonzalez-Murua, C., Royuela, M. (1996.): Influence of imazethapyr on *Rhizobium* growth and its symbiosis with pea (*Pisum sativum*). Weed science 44: 31-37.
11. Goršić, M., Barić, K. (2009.): Mogućnost kemijskog suzbijanja korova u krmnim leguminozama. Glasilo biljne zaštite 1-2: dodatak:23-24.
12. Hungria, M., Mendes, J.C., Nakatani, A.S., Reis-Junior, F.B., Morais, J.Z., de Oliveira, M.C.N., Fernandes, M.F. (2014.): Effects of the glyphosate-resistance gene and herbicides on soybean: Field trials monitoring biological nitrogen fixation and yield. Field Crops Research 158: 43-54.

13. Locke M.A., Zablotowicz R.M. (2004.): Pesticide in Soil - benefits and limitations to Soil Health. *Soil Quality: Challenges in modern Agriculture*: 239 – 260.
14. Milošević, N.; Cvijanović, G., Tintor, B., (2006.): Herbicides effects on microbial activity in agricultural soil. *Herbologia* 7,(2): 57-70.
15. Nomen nescio (2007.): Imazamox, clomazone, pendimethalin. *Herbicide Handbook*, Weed Science Society of America. Ninth Edition, USA.
16. Ramirez-Bahena, M.H., Garcia-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J.M., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Velazquez, E. (2008.): Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889^{AL}, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926^{AL} and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926^{AL}. *R. trifolii* is a later synonym of *R.leguminosarum*. Reclassification of the strain *R.leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp.nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2484-2490.
17. Redžepović, S. (1981.): Utjecaj nekih herbicida na mikrofloru tla u ponovljenom uzgoju kukuruza. Disertacija. Fakultet poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu.
18. Shivaramaiah, H.M., Kennedy, I.R. (2006.): Biodegradation of endosulfan by a soil bacterium. *Journal of Environmental Science And Health part B*; 41: 895-905.
19. Sikora, S., Blažinkov, M., Babić, K., Sudarić, A., Redžepović, S. (2008.): Symbiotic nitrogen fixation and sustainable soybean production. *Cereal Research Communications* 36, S5: 1483-1486.
20. Singh, G., Wright, D. (1999.): Effects of herbicides on nodulation, symbiotic nitrogen fixation, growth and yield of pea (*Pisum sativum*). *Journal of Agriculture Science* 133: 21-30.
21. Singh, G., Wright, D. (2002.): *In vitro* studies on the effects of herbicides on the growth of rhizobia. *Letters in applied Microbiology* 35: 12-16.
22. Somerville, L., Greaves, M.P. (1987.): *Pesticide Effects on Soil Microflora*. Taylor & Francis, London.
23. Štafa, Z. (1997): Sjetva krmnog (stočnog) graška. *Gospodarski list*, Zagreb (16): 47.
24. Vincent, J.M. (1970): *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. IBP Handbook No. 15.

Adresa autora – Author’s address:

izv.prof. dr.sc. Mihaela Blažinkov,
e-mail adresa autora za korespondenciju –
corresponding authore e-mail address:
mihaela@agr.hr

Ana Šnajdar, Prof.dr.sc. Sanja Sikora,
Ivana Rajnović, dipl.ing., dr.sc. Sulejman
Redžepović professor emeritus
Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
Zavod za mikrobiologiju
Svetošimunska 25, 10 000 Zagreb

Doc.dr.sc. Klara Barić
Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
Zavod za herbologiju
Svetošimunska 25, 10 000 Zagreb

Primljeno – recived:

07.08.2014.

