

**Renata DEJANOVIĆ<sup>1</sup>, Hrvoje SAMBOLEK<sup>2</sup>, Darko TOPOLOVEC<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Bayer d.o.o., Zagreb

<sup>2</sup>Agrobiotest d.o.o.

renata.dejanovic@bayer.com

## **REZISTENTNOST KOROVA *SORGHUM HALEPENSE* NA HERBICIDE IZ SKUPINE INHIBITORA ACETOLAKTAT SINTAZE (ALS) I INTEGRIRANI PRISTUP U SUZBIJANJU**

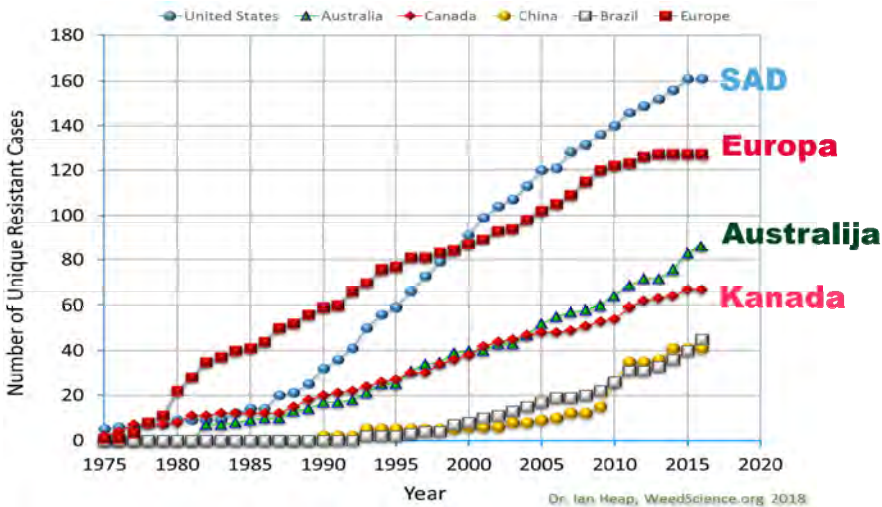
### **SAŽETAK**

Tijekom 2017. godine, u pokusima u kukuruzu, na lokaciji Dubrovčak Lijevi, primjetili smo izostanak učinkovitosti pojedinih herbicida iz skupine inhibitora acetolaktat sintaze (ALS) na korovsku vrstu *Sorghum halepense* (divlji sirak). Prikupili smo uzorke rizoma divljeg sirka iz tri varijante u pokusu i poslali na analizu u Bayerov Weed Resistance Competence Centar u Njemačku. Analizirane su mutacije gena u korova SORHA koje uzrokuju otpornost na ciljanom mjestu djelovanja (target site rezistentnost) ALS herbicida (herbicidi u našem pokusu) s pomoću tehnike molekularne biologije bazirane na PCR tehnologiji (polimerazna lančana reakcija). Analize niza DNA obavljene su s pomoću pirosekvencera. Rezistentnost na ciljano mjesto djelovanja na široki spektar ALS inhibitora potvrđena je prisutnošću ALS 574 mutacije u visokoj frekvenciji u svim uzorcima – i na nikosulfuron i na foramsulfuron. U sva tri naša uzorka utvrđena je u mnogim jedinkama divljeg sirka mutacija na najmanje dvije kopije gena od četiri, što upućuje na njegovu visoku rezistentnost na ALS inhibitore. Dokaz o postojanju rezistentnosti korova *Sorghum halepense* pokazuje da je krajnji rok da se sve zainteresirane strane, od Ministarstva poljoprivrede, znanstvenih i stručnih institucija, savjetodavnih tijela, industrije, distributivnih lanaca i OPG-ova, uključe u rješavanje te problematike, i to u istraživanju i otkrivanju rezistentnih korovskih vrsta, u edukaciji i informiranju o pojavi rezistentnosti te u promoviranju praksi koje uključuju integraciju kemijskih i nekemijskih mjera suzbijanja korova. Jedna od takvih praksi uključuje Bayerov program integriranog suzbijanja korova (IWM) koji omogućuje održivo suzbijanje korova na našim poljima s pomoću različitih metoda (kemijskih, fizičkih i bioloških) koje se međusobno nadopunjuju u postizanju visoko učinkovite zaštite usjeva protiv korova te u što duljem očuvanju djelotvornosti postojećih djelatnih tvari odnosno postojećih mehanizama djelovanja na tržištu.

### **UVOD**

Borba protiv sve većeg broja rezistentnih vrsta korova širom svijeta, zadnjih godina, postaje jedan od vodećih problema u poljoprivrednoj proizvodnji, a

ujedno zahtijeva i složeniji pristup u rješavanju te problematike. Stalno raste broj novih slučajeva rezistentnosti korova na pojedine herbicide različitog mehanizma djelovanja. Europa je po tome u samom vrhu (Slika 1).



**Slika 1.** Povećanje broja rezistentnosti korovskih vrsta u različitim dijelovima svijeta (Heap, 2018)

Prema podacima [www.WeedScience.org](http://www.WeedScience.org) iz 2017., a oni se stalno periodično nadopunjavaju, do danas je dokazana rezistentnost za 251 vrstu korova u 92 usjeva i 69 zemalja. U dvije velike kulture u Europi, pšenici i kukuruzu, zabilježeno je i dokazano najviše slučajeva rezistentnosti korova, i to na najvažnije korove u tim kulturama. U pšenici je dokazana rezistentnost na 10 travnih i 14 širokolisnih vrsta (najvažnije korovske vrste *Alopecurus myosuroides*, *Apera spica-venti*, *Lolium sp.*, *Amaranthus retroflexus*, *Papaver rhoeas*), a u kukuruzu je dokazana rezistentnost na 10 travnih i 28 širokolisna korova (najvažnije korovske vrste *Echinochloa crus-galli*, *Setaria sp.*, *Panicum dichotomiflorum*, *Sorghum halepense*, *Amaranthus retroflexus*, *Polygonum sp.*). Na neke korove zabilježena je čak višestruka rezistentnost, odnosno rezistentnost na više mehanizama djelovanja (npr. samo u Belgiji dokazana je rezistentnost *Alopecurus myosuroides* na pet različitih mehanizama djelovanja) (weedsience, 2018).

Osim izazova što donosi povećanje broja korovskih vrsta rezistentnih na pojedine djelatne tvari odnosno mehanizme djelovanja herbicida, Europa je, pa time i Hrvatska, suočena i s vrlo strogim zakonodavstvom i kriterijima za priznavanje djelatnih tvari i sredstava za zaštitu bilja. Svjedoci smo da zadnjih godina nisu uvrštene mnoge djelatne tvari na

europsku listu, čime se ujedno na tržištu smanjuje i broj različitih mehanizama djelovanja, a to dodatno otežava borbu protiv rezistentnosti i dodatni je izazov u poljoprivrednoj proizvodnji.

Situacija u području registriranih djelatnih tvari i različitih mehanizama djelovanja (MoA) u Hrvatskoj na primjeru naše najveće kulture, kukuruza, ovakva je: imamo registrirane 22 djelatne tvari iz 8 skupina različitog mehanizma djelovanja (Tablica 1.) (Fis, 2018). Najbrojnija skupina jesu inhibitori ALS (sulfonilurea herbicidi). Prema HRAC-ovim preporukama barem četiri mehanizma djelovanja potrebno je za provesti anti-rezistentnu strategiju.

U strogim regulatornim kriterijima u Europi vezanim za registraciju sredstava za zaštitu bilja, neizvjesna je situacija oko statusa mnogih djelatnih tvari koje su registrirane u kukuruzu, a to u budućnosti može prouzročiti složenu i kompliciranu situaciju u zaštiti te kulture. Moramo iskoristiti sve mehanizme koji nam se daju da održimo što više različitih mehanizma djelovanja odnosno što je moguće više djelatnih tvari iz drugih skupina koje su registrirane u kukuruzu, a imaju bilo kakav učinak na sirak.

**Tablica 1.** Pregled registriranih djelatnih tvari prema mehanizmu djelovanja u kukuruzu u Hrvatskoj prema HRAC klasifikaciji (HRAC, 2018; Fis, 2018)

Mehanizam (mjesto) djelovanja (HRAC codes)	Djelatne tvari
1. Inhibitori acetolaktat sintaze ALS) <b>B</b> (sulfonilurea, imidazoloni, triazolopirimidine, pirimidini/(thio)benzoate, sulfonilaminocarbonil-triazolinone)	rimsulfuron, nicosulfuron, florasulfuron, prosulfuron, triflorsulfuron, tiencerbazon-metil, florasulam
2. Inhibitori biosinteze 4-HPPD - „bleacheri“ <b>F2</b> (triketoni, izoksazoli, pirazoli)	izoksafliutol, lembotrion, mezotrion
3. Inhibitori izgradnje mikrotubula <b>K1</b> (dinitroanilini, fosforamidati, pindini, benzamidi, benzojeva kiselina)	pendimetalin
4. Inhibitori diobe stanica <b>K3</b> (kloroacetamidi, acetamidi, oxyacetamidi, tetrazolinoni)	S-metolachlor, dimetenamid-P, petoksamid
5. Inhibitori fotosinteze u fotosustavu II <b>C1</b> (triazine, triazinone, triazolinone, uracil, pindazinone, phenyl-carbamate)	terbutilazin
6. Inhibitori fotosinteze u fotosustavu II <b>C3</b> (nitrile, benzothiadiazinone, phenil-pyridazine)	bromoksini, bentazon, piridat
7. Sintetski auksini, regulatori rasta ili hormonski herbicidi <b>O</b> (derivati fenoksi karboksilnih kiselina, benzoic acid, piridin karboksilne kiseline, kinolin karboksilne kiseline)	Dicamba, 2,4 D, kloralid, fluoksipir
8. Inhibitori PPO (protoporfirinogen oksidaze) <b>E</b> (difenileteri, fenilpirazoli, N-fenilftalimidi, liadiazoli, oksadiazoli, triazolinoni, oksazolidinedioni, pirimidindioni)	Flumoksazin

Zadnjih nekoliko godina imali smo puno pritužbi poljoprivrednih proizvođača na djelotvornost pojedinih sredstava za zaštitu bilja. Najviše

pritužbi bilo je na herbicide u kukuruzu, najviše na one koji pripadaju u skupinu inhibitora ALS, da ne djeluju na divlji sirak (*Sorghum halepense*). Provođeci pokus u Dubrovčaku Lijevom 2017. godine, gdje smo ispitivali učinkovitost različitih ALS herbicida na korove u kukuruzu, uočili smo jako slabu učinkovitost gotovo svih herbicida korištenih u pokusu na divlji sirak (*Sorghum halepense*).

## MATERIJAL I METODE

U pokusu 2017. godine na lokaciji Dubrovčak Lijevi ispitivali smo učinkovitost herbicida iz skupine inhibitora ALS na *Sorghum halepense*.

Pokus se sastojao od ukupno 6 varijanti uključujući i kontrolu:

1. Kontrola/netretirano
2. Tienkarbazon-metil + Foramsulfuron 1,8 lit/ha – B rok primjene
3. Tienkarbazon-metil + Foramsulfuron 2,0 lit/ha – B rok primjene
4. Nikosulfuron + mezotrion 1,5 lit/ha – B rok primjene
5. Nikosulfuron 1,25 lit/ha – B rok primjene
6. Isoksaf lutol + tienkarbazon-metil 0,44 lit/ha – A rok primjene  
Tembotrion – 2,0 lit/ha – B rok primjene

Pokus je postavljen u 3 ponavljanja slučajnim bloknim rasporedom. Veličina jednog plota u pokusu iznosila je 12,5 m<sup>2</sup>. Tretiranja su obavljena u dva roka primjene: **A rok** primjene: 12.5.2017. (samo u 6 varijanti IFT + TCM) i **B rok** primjene 26.5.2017. (svi ostali). Utrošak vode iznosio je 240 l/ha.

U trenutku tretiranja kultura i korov bili su u sljedećim fenofazama razvoja, kukuruz BBCH 12 u A roku primjene i BBCH 14-15 u B roku primjene, a *Sorghum halepense* BBCH 12-13 u A roku primjene i BBCH 21-23 u B roku primjene.

Ocjena učinkovitosti provođena je četiri puta: 14 dana nakon A roka primjene: 26.5.2017., 14 dana nakon B roka primjene: 10.6.2017., 28 dana nakon B roka primjene: 23.6.2017., 42 dana nakon B roka primjene: 7.7.2017.

Učinkovitost herbicida iskazana je u postotcima i obračunata je po Abottu, a kontrola je prikazana brojem korova po m<sup>2</sup>. Prosječni broj biljaka *Sorghum halepense* u pokusu iznosio je 20,7 biljaka/m<sup>2</sup>.

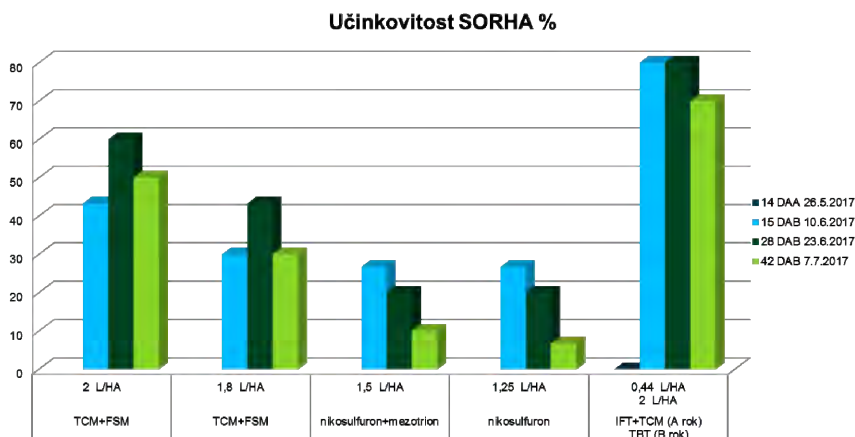
Uzorke rizoma korova *Sorghum halepense* skupili smo 11.10.2017. s tri varijante 3., 4. i 5., obložili smo ih vlažnim papirom i takve poslali na analizu u Bayerov istraživački centar za rezistentnost u Njemačku (Weed Resistance Competence Centar) gdje se koriste dokazane dijagnostičke

metode za utvrđivanje rezistentnosti (biotestovi u staklenicama i u laboratoriju tehnike molekularne biologije bazirane na PCR tehnologiji za utvrđivanja metaboličke i target site rezistentnosti).

U našem slučaju analizirane su mutacije gena u korova SORHA koje uzrokuju otpornost na ciljanom mjestu djelovanja ALS herbicida (target site rezistentnost) s pomoću tehnike molekularne biologije bazirane na PCR tehnologiji (polimerazna lančana reakcija). Analize niza DNA obavljene su s pomoću pirosekvencera. Testirani su uzorci s tri varijante u pokusu 3., 4. i 5. varijante.

## REZULTATI

Iz slike 2. i 3. vidljivo je da je potpuno izostala učinkovitost herbicida na divlji sirak (*Sorghum halepense*). Iako su primijenjeni različiti herbicidi, gotovo svi pripadaju skupini inhibitora ALS. Nešto bolji učinak pokazala je varijanta 6. u kojoj je u B roku primijenjen herbicid drugog mehanizma djelovanja. Tu treba još nadodati da je nakon tretmana u A roku nakon tri dana pala kiša, a u ostalom vremenu prevladavale su više temperature i bilo je jako malo oborina, što je svakako imalo utjecaja na djelotvornost herbicida.



Slika 2. Učinkovitost herbicida inhibitora ALS na *Sorghum halepense* (Dubrovčak Lijevi, 2017.)

U svim uzorcima uzetim s tri različite varijante (3., 4. i 5.) analize su utvrdile prisutnost ALS 574 mutacije u visokoj frekvenciji i također prisutnost ALS 197 mutacije u nešto nižoj frekvenciji, čime je nepobitno dokazana rezistentnost korova *Sorghum halepense* na herbicide iz skupine inhibitora ALS nikosulfuron i foramsulfuron.



**Slika 3.** Pokus učinkovitosti herbicida inhibitora ALS na *Sorghum halepense* u kukuruzu u Dubrovčaku Ljevom 2017. (snimio V. Ljubičić)

*Sorghum halepense* je tetraploidna (4N) biljka, što znači da ima četiri kopije svakoga gena. Za *Sorghum halepense* zna se da mutacija jedne kopije gena od četiri kopije daje slabu rezistentnost koja nije signifikantna na polju, ali prisutnost mutacije već na dvije kopije gena od četiri kopije daje visoku rezistentnost.

**Tablica 2.** Rezultati analize mutacije gena kod *Sorghum halepense* bazirane na PCR tehnologiji

ACCCase		Uzorak SORHA 1. 3. varijanta (Foramsulfuron+TCM 2 L/ha)		Uzorak SORHA 2. 4. varijanta (nikosulfuron+mezotrion 1,5 L/ha)		Uzorak SORHA 3. 5. varijanta (nikosulfuron 1,25 L/ha)	
		Target site rezistentnost	Mutacije	Target site rezistentnost	Mutacije	Target site rezistentnost	Mutacije
	I1781-1	NE	0%	NE	0%	NE	0%
	W2017-3	NE	0%	NE	0%	NE	0%
	I2041-2	NE	0%	NE	0%	NE	0%
	D2078-2	NE	0%	NE	0%	NE	0%
	G2096-2	NE	0%	NE	0%	NE	0%
ALS	P197-1T	DA	60%	DA	57%	DA	50%
	W574-2L	DA	86%	DA	100%	DA	88%

To je provjereno u sva tri naša uzorka i u sva tri uzorka mutacija na najmanje dvije kopije gena od četiri kopije bila je prisutna u mnogim jedinkama. To potvrđuje značajnu rezistentnost na ALS inhibitore (Tablica 2.).

## RASPRAVA I ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja nepobitno su utvrdili postojanje rezistentnosti korova *Sorghum halepense* na herbicide iz skupine ALS na području Dubrovčaka Lijevo. To je lokalitet na kojem dominira proizvodnja kukuruza, a na njemu su glavna obilježja manje parcele, uski plodored ili monokultura kukuruza, divlji sirak iz rizoma kao dominantni korov, forsiranje post-em tretmana s istim mehanizmom djelovanja, jednostrane preporuke, a sve to, uz reduciraniju obradu i poddoziranje preparata, glavni je uzrok pojave rezistentnosti. Kad se utvrdi rezistentnost nekog korova, daljni cilj trebao bi biti odrediti status ostalih dostupnih herbicida, drugih opcija, te shvatiti status rezistentnosti što je moguće bolje da bi se poljoprivrednicima pružile najbolje moguće preporuke za njihova polja.

To zahtijeva širenje saznanja o problematici, djelovanje svih zainteresiranih strana u otkrivanju, dokazivanju rezistentnosti, zatim edukaciju poljoprivrednih proizvođača i demonstraciju različitih strategija u polju.

Bayer je na globalnoj razini pokrenuo već prije nekoliko godina projekt integriranog suzbijanja korova (IWM – Integrated weed management) i propisao osnovne smjernice za integrirano suzbijanje korova koje daju jednostavne upute, razumljive široj javnosti. Svaka zemlja uvodi IWM, prilagođavajući ga uvjetima u svojoj zemlji i problematici u toj zemlji. Kroz različite inicijative, suradnju sa znanstvenicima te kreiranjem programa nastojimo odgovoriti na sve važne izazove koje poljoprivredna proizvodnja stavlja pred sve nas. Integrirano suzbijanje korova obuhvaća različite metode suzbijanja korova, a cilj tog pristupa suzbijanja korova jest: smanjiti i spriječiti rast te pritisak korova da bi herbicidi lakše djelovali, zatim jednostavnije uklanjanje konkurentskih korovskih vrsta, postizanje visokih prinosa, a indirektno s integriranim suzbijanjem korova i dugoročno štititi postojeća herbicidna rješenja. Herbicid s novim načinom djelovanja nije otkriven u posljednjih 30 godina, a niti jedan se niti ne očekuje na tržištu u bližoj budućnosti.

Činjenica da smo u Hrvatskoj dokazali rezistentnost *Sorghum halepense* na ALS herbicide u kukuruzu (to je skupina herbicida koji su donijeli revoluciju u suzbijanju toga korova u ovoj kulturi), a da ćemo u svim kulturama imati primjenu ALS herbicida te zahtjevu i nesigurnu regulatornu situaciju vezanu uz status mnogih postojećih djelatnih tvari, ponukala je i nas u Hrvatskoj da počnemo implementaciju IWM projekta na naše tržište, a na tome ćemo intenzivno raditi u sljedećim godinama. Plan IWM aktivnosti u idućim godinama obuhvaća uspostavljanje IWM platforme (višegodišnji pokusi na istom polju

gdje će se testirati IWM programi i rješenja), dijagnostiku, suradnju sa znanstvenim i stručnim institucijama na razvoju lokalne anti-rezistentne strategije i planova zaštite za suzbijanje rezistentnog divljeg sirka, zatim komunikaciju s javnošću, edukaciju poljoprivrednih proizvođača i distributera te registraciju proizvoda s više različitih mehanizama djelovanja.

## LITERATURA

**Heap, I.,** (2018). International survey of herbicide resistant weeds (Powerpoint charts available for download), dostupno na: <http://www.weedscience.org> (pristupljeno: 5.2.2018.)

**WeedScience.org,** (2018). International survey of herbicide resistant weeds, Dostupno na: <http://www.weedscience.org> (pristupljeno: 5.2.2018)

**HRAC,** (2018). Herbicide Resistance Action Committee (Classification of Herbicides According to Site of Action), dostupno na: <http://www.hracglobal.com/pages/classificationofherbicidesiteofaction.aspx> (pristupljeno: 5.2.2018)

**Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske,** Fisportal (2018). Tražilica registriranih sredstava za zaštitu bilja , dostupno na: <https://fis.mps.hr/trazilicaszb/> (pristupljeno: 5.2.2018.)

**Stručni rad**