

Maja ŠČEPANOVIĆ, Valentina ŠOŠTARČIĆ, Laura PISMAROVIĆ
Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za herbologiju
mscepanovic@agr.hr

ALELOKEMIKALIJE POKROVNIH KULTURA – POTENCIJALNI BIOHERBICIDI

SAŽETAK

Unatoč brojnim prednostima koje su pesticidi donijeli poljoprivrednoj proizvodnji, danas se nastoji razviti održivi sustav suzbijanja štetnih organizama manje oslanjan na njihovu primjenu. Osnovna ideja održivog suzbijanja korova temelji se na njegovu postupnom potiskivanju i sprječavanju daljnjeg širenja kako bi se spriječila ekonomske štete u usjevima i dugoročna zakorovljenost. Taj pristup, uz primjenu herbicida, uključuje i skup ostalih mjera koje mogu sinergistički utjecati na smanjenje zakorovljenosti, poput plodoređa, obrade tla, međuusjeva, pokrovnih usjeva te primjene raznih bioloških sredstava. Bioherbicidi su proizvodi za suzbijanje korova koji se dobivaju iz živih organizama, uključujući sve prirodne proizvode koje stvaraju tijekom svog rasta. Biološko podrijetlo većine bioherbicida može biti mikrobno (bakterije, gljivice, virusi, nematode), biljno (proizvodi biljnog podrijetla) i mineralno (ulja). Zajednička je karakteristika bioherbicida ekotoksikološka prihvatljivost jer često ti spojevi ne ostaju aktivni u okolišu dulje vrijeme, pa je manja vjerojatnost da će uzrokovati kontaminaciju tla i vode, a i nemaju negativan učinak na neciljane organizme. Bioherbicidi biljnog podrijetla najčešće uključuju sekundarne metabolite biljaka, tzv. alelokemikalije, od kojih je većina topiva u vodi, što ih čini lakim za izolaciju i primjenu. Alelokemikalijski bioherbicidi obično imaju kratkotrajnu postojanost u okolišu i nisku toksičnost te često višestruke načine djelovanja, što smanjuje rizik od razvijanja rezistentnih populacija korova.

UVOD

Briga za okoliš i svijest o štetnosti dugoročne primjene agrokemikalija glavna je odrednica agrarne politike Europske unije, direktive o Održivoj uporabi pesticida (Direktiva 2009/128/EZ) i strategije Zeleni plan (*European Green Deal*). Istodobno, gubitci prinosa u vodećim prehrambenim usjevima uzrokovani štetnim organizmima iznose oko 70 %, što prema procjenama FAO-a iznosi preko 290 milijarda dolara. Pritom na korove otpada i preko 30 % (Oerke, 2006.).

Korovi su ograničavajući čimbenik proizvodnje većine poljoprivrednih usjeva. Prema procjenama istraživača te biljne vrste snižavaju prinose većine ekonomski značajnih poljoprivrednih usjeva više nego uzročnici biljnih bolesti i

štetnici. Ipak, relativno je teško precizno procijeniti gubitke prinosa uzrokovanih korovima jer ti gubitci variraju ovisno o vrsti korova, gustoći zakorovljenosti te vremenu nicanja korova u odnosu na usjev. Općenito, gubitak prinosa zbog korova gotovo je uvijek uzrokovan prisutnošću više različitih vrsta korova u usjevu, a svaka korovna vrsta ima drugačiju kompetitivnu sposobnost prema usjevu. Stoga se rijetko u procjenama gubitka prinosa referira na pojedinačnu korovnu vrstu, nego se gubitci prinosa procjenjuju kao zajednički efekt svih prisutnih korova u usjevu, što najčešće nije tako kod uzročnika biljnih bolesti i štetnika. Ipak, globalno gledajući, korovi uzrokuju najveći potencijalni gubitak prinosa (34 %), za razliku od štetnika i biljnih patogena (gubitci od 18 i 16 %) (Oerke, 2006.).

Od sredine 40-tih godina prošlog stoljeća agrokemijske kompanije komercijalizirale su nekoliko tisuća različitih herbicida koji su uspješno zamijenili mehaničke mjere suzbijanja korova i značajno umanjili utrošak ljudskog rada. Primjena herbicida značajno je unaprijedila ekonomsku stranu suzbijanja korova, povećala profit i učinak suzbijanja korova i značajno umanjila utrošak radne snage za suzbijanje korova. Dodatno, herbicidima je bilo moguće suzbiti korove i u onim usjevima/nasadima gdje nije moguće obaviti mehaničke mjere njegova suzbijanja.

Unatoč neminovnim prednostima koje su herbicidi donijeli poljoprivrednoj proizvodnji, danas je namjera reducirati njihov unos u okoliš, a dugoročno razviti održivi sustav suzbijanja korova koji se ne bi oslanjao na primjenu herbicida. Osim ekotoksikološkog problema, dugotrajna primjena pesticida uzrokovala je razvoj rezistentnih štetnih organizama na sredstva za zaštitu bilja. Tako su u mnogim agroregijama utvrđene populacije korova rezistentne na herbicide. Recentni podatci ukazuju da su i u našoj zemlji ambrozija (*Ambrosia artemisiifolia* L.) i divlji sirak (*Sorghum halapense* L.) u usjevu kukuruza i soje razvili rezistentnost na neke herbicide iz skupine inhibitora acetolaktat sintaze (sulofnilureja). To zahtjeva potpuni preokret u uzgoju ovih poljoprivrednih usjeva uz značajno manje oslanjanje na kemijske mjere suzbijanja (Šćepanović i sur., 2020.).

ODRŽIVO SUZBIJANJE KOROVA

Danas je iznimno važno da primjena herbicida bude precizna, tj. strogo usmjerena na određenu korovnu vrstu s ciljem da što manje herbicida dospije u okoliš. Općenito je namjera da se za suzbijanje korova (i ostalih štetnih organizama) umanjí potrošnja sintetičkih herbicida, a poveća potrošnja različitih prirodnih spojeva, odnosno da se primijene alternativne mjere.

Biopesticidi su prvi put uvedeni na tržište 1980. godine, a otada je nekoliko biopesticida, uključujući bioinsekticide, biobaktericide, biofungicide uvedeno na globalnoj razini. No, tržišni udio bioherbicida još uvijek čini manje od 10 %

svih biopesticida. Od registriranih bioherbicida¹ na svjetskom tržištu mnogi su dobiveni iz mikroorganizama koji se prirodno nalaze u okolišu, a dokazano nemaju negativan utjecaj na ljude i neciljane organizme. Biološko podrijetlo većine bioherbicida je mikrobno (bakterije, gljivice, virusi, nematode), biljno (proizvodi biljnog podrijetla) i mineralno (ulja). Zajednička karakteristika bioherbicida je ekotoksikološka prihvatljivost jer često ti spojevi ne ostaju aktivni u okolišu dulje vrijeme, manja je vjerojatnost da će uzrokovati kontaminaciju tla i vode, a i nemaju štetne učinke na neciljane organizme.

Znanstvenici u borbi protiv korova intenzivno istražuju različita eterična ulja, poljoprivredne nusproizvode i vodene ekstrakte iz mnogih biljnih vrsta. Vodeni ekstrakti biljnih vrsta bogatih biološkim spojevima (alelokemikalijama) koji mogu potisnuti korove posebno su značajni. Upravo se zbog toga preporučuje uključiti pokrovne usjeve u plodored. Naime, biljne vrste koje se koriste kao pokrovni usjevi dokazano imaju dobar učinak na korove jer su to biljke kompetitivnog i alelopatskog djelovanja.

Pokrovni usjevi (*cover crops*) važna su komponenta održivog suzbijanja korova u jednogodišnjim i višegodišnjim sustavima uzgoja. Oni imaju nekoliko „blagotvornih“ učinaka na poljoprivredne usjeve, poput smanjenja erozije vjetrom i vodom, povećanja biološke aktivnosti tla, prevencije ispiranja hraniva, zaštite tla tijekom zime ili ljeta, održavanja povoljnog odnosa ugljika i dušika, poboljšanja vodozračnih odnosa u tlu i dr. Među prednostima pokrovnih usjeva suzbijanje korova često se spominje kao jedna od njih. Pokrovni usjevi sačinjeni su od biljnih vrsta iz porodica Fabaceae, Poaceae i Brassicaceae, a izbor ovisi o njegovoj namjeni, stanju tla, kao i lokaciji usjeva. Ovisno o cilju uzgoja, izbor biljnih vrsta također ovisi o lakoći uspostavljanja, pokrivenosti tla i sposobnosti potiskivanja korova, otpornosti na bolesti te niskoj konkurentnosti s glavnim usjevom, kao i brzom završetku vegetacije. Interakcija pokrovnog usjeva i korova događa se za vrijeme intenzivna rasta pokrovnog usjeva, ali i nakon što uzgajani pokrovni usjev završi životni ciklus i bude inkorporiran u tlo ili ostane na površini tla. Općenito su biljne vrste koje stvaraju veliku bujnu masu učinkovitije za suzbijanje korova, posebice vrste iz porodica Brassicaceae i Poaceae. Razvijena biomasa pokrovnog usjeva zasjenjuje tlo, smanjuje dostupnost vode u tlu, a sve to utječe i na nicanje korovnih vrsta. Važno je istaknuti kako, za razliku od primjene herbicida, pokrovni usjevi nemaju brz (*knock down*) učinak, već se on postiže uzastopnim dugogodišnjim korištenjem. Primjerice, u poljskom istraživanju (Barić i sur., 2020.) učinak pokrovnih kultura na redukciju broja jedinki korova nije utvrđen u prvoj godini istraživanja iako je masa korova bila reducirana od 48,8 do 78,8 %. Autori naglašavaju da bi višegodišnjom sjetvom pokrovnih kultura potencijal korova mogao biti znatno oslabljen, a to bi rezultiralo i njegovom manjom

¹ https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides_en

sjemenskom proizvodnjom. Dodatno, razvijena svježa nadzemna masa pokrovnih kultura, u istom istraživanju, iznosila je od 19,4 do 79 t ha⁻², što je, osim smanjenja potencijala korova, značajan potencijal za povećanje organske tvari u tlu.

Osim što svojom nadzemnom masom pokrovni usjevi „guše“ korov ne dopuštajući njegov rast i razvoj, te biljne vrste imaju alelopatski učinak na korove. To znači da izlučuju sekundarne metabolite (alelokemikalije) koji često imaju inhibirajuće djelovanje prema korovima. Biljke sadrže alelokemikalije u većini biljnih organa: korijenu i rizomima, stabljikama, lišću, cvijetu, peludi, plodu i sjemenu. Istraživanjima je dokazano da listovi i plodovi pokrovnih usjeva sadržavaju značajno veće koncentracije alelokemikalija u odnosu na korijen i stabljiku tih biljnih vrsta (Brijačak i sur., 2021.). Ove spoznaje ukazuju na to da je inkorporaciju pokrovnih usjeva poželjno obaviti u vrijeme njihove cvatnje s ciljem jače inhibicije korova putem unesenih alelokemikalija. Biljne vrste koje se uzgajaju za pokrovni usjev sadržavaju različite koncentracije alelokemikalija, što je također kriterij za njihov odabir. Primjerice, u *in vitro* istraživanjima utvrđeno je da vrsta sjetveni podlanak (*Camelina sativa* (L.) Crantz) (Brassicaceae) jače inhibira klijanje i početni rast korovnih vrsta koštana (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.), sivoga muhara (*Setaria pumila* Poir.) i ambrozije u odnosu na druge vrste iz te porodice (Šćepanović i sur., 2022.; Brijačak i sur., 2021.). Stoga je sjetveni podlanak poželjno uključivati u plodored, posebice na onim površinama koje su značajno zakorovljene spomenutim korovnim vrstama.

ALELOKEMIKALIJE – BIOHERBICIDI

Pokrovni usjevi iz porodice Brassicaceae bogati su biološki aktivnim spojevima glukozinolatima koji posjeduju herbicidna svojstva, što je dokumentirano u brojnim istraživanjima. Tako se primjerice inhibicijski učinak gorušice (*Sinapis alba* L.) povezuje s velikom koncentracijom glukotropeolina, glukozinalbina i glukobrasicina u njezinim biljnim organima. Također, **fenolni spojevi** često se navode kao vodeći spojevi s inhibirajućim potencijalom prema korovima. Korovne vrste fenolne spojeve mogu usvajati podzemnim i nadzemnim dijelovima. Suzbijanje korova prilikom usvajanja podzemnim biljnim organima podrazumijevalo bi sjetvu i potom unošenje pokrovnih usjeva bogatim fenolnim kiselinama u tlo (zelena gnojidba). U poljskim uvjetima, međutim, nekoliko čimbenika može smanjiti snagu inhibicije fenolnih spojeva prema korovu. Nakon ulaska u tlo (inkorporacije), mikroorganizmi tla mogu razgraditi ili iskoristiti fenolne spojeve i tako smanjiti njihovu biološku aktivnost. Nadalje, usvajanje fenolnih spojeva putem korijena može biti otežano jer se neke fenolne kiseline (*p*-kumarinska, protokatehinska ili kafeinska kiselina) lako adsorbiraju na minerale gline i tvore helatne komplekse s metalima u tlu, čime

postaju korovima nedostupne. S druge strane, ako se alelopatski pokrovni usjevi koriste za suzbijanje korova u polju, dobra poljoprivredna praksa i pedoklimatski uvjeti ključni su za učinkovito suzbijanje korova. Primjerice, kasniji datum sjetve može rezultirati slabijim suzbijanjem korova jer se proizvodi manje biomase ili se koncentracija glukozinolata u biljnim tkivima smanjuje od klijanja do rasta biljke. Osim toga, sposobnost suzbijanja uvođenjem pokrovnih usjeva u plodored ovisi o dovoljnoj količini oborina za njihovo nicanje i rast. I u konačnici, intenzitet alelopatskog učinka u polju ovisi o različitim transformacijama koje će organski spojevi pretrpjeti nakon ispuštanja u okoliš. Zbog toga je inhibitorne alelokemikalije možda učinkovitije primjenjivati folijarno, odnosno koristiti kao bioherbicide.

S obzirom na to da je **fenolne spojeve lako izolirati** iz biljnih tkiva i topivi su u vodi, učestalo se koriste u alelopatskim istraživanjima. Tako je utvrđeno da su hidroksibenzojeva kiselina, protokatehuinska kiselina i vanilinska kiselina, izolirane iz pokrovnih usjeva, inhibirale početni rast korovnih vrsta koštana i sitne konice (*Galinsoga parviflora* Cav.). Također su salicilinska, ferulinska te hidroksifenil octena kiselina iskazale alelopatske učinke prema divljoj zobi (*Avena fatua* L.). Zbog toga se na Agronomskom fakultetu, na Zavodu za herbologiju posljednjih godina intenzivno istražuje mogućnost primjene fenolnih spojeva kao prirodnih herbicida. Ti spojevi izolirani su iz biljnih tkiva pokrovnog usjeva sačinjena od pet biljnih vrsta: podlanak, uljna rotkva (*Raphanus sativus* var. *oleiformis* Pers.) i bijela gorušica (*Sinapis alba* L.) iz porodice Brassicaceae, heljda (*Fagopyron esculentum* Moench.) iz porodice Polygonaceae te mungo (*Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass.) iz porodice Asteraceae. U prvom *in vitro* istraživanju utvrđeno je da su vrste iz porodice Brassicaceae značajno jače inhibirale klijanje i početni rast korovnih vrsta ambrozije, koštana i muhara u odnosu na vrste iz drugih porodica. Ovo i jest jedan od razloga što su te vrste gotovo uvijek uključene u smjese biljnih vrsta za pokrovne usjeve. Tijekom daljnjih *in vitro* istraživanja uspješno su tekućinskom kromatografijom izolirani fenolni spojevi za koje se smatra da su odgovorni za inhibitorni učinak prema korovima. Tako je iz nadzemnih dijelova navedenih pokrovnih usjeva izolirano 15 fenolnih spojeva od kojih su vanilinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, vanilin, hidroksibenzenska kiselina, klorogenska kiselina, galska kiselina, protokateutinska kiselina te siringinska kiselina dalje testirane kao potencijalni bioherbicidi. Rezultati ovih istraživanja istaknuli su četiri fenolne kiseline kao one koje imaju najjači inhibicijski potencijal prema testnoj korovnoj vrsti – ambroziji, a to su: *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, vanilinska kiselina i *p*-hidroksibenzojeva kiselina. Navedene kiseline testirane su u onim dozacijama u kojima se prirodno nalaze u nadzemnim biljnim dijelovima pokrovnih usjeva, ali i u 2 do 16 puta većim dozacijama. Rezultati istraživanja ukazuju da se bioherbicidni učinak samostalno primijenjenih fenolnih spojeva postiže samo njihovom primjenom u znatno

većim koncentracijama nego što su prirodno prisutne u biljnim tkivima. Primjerice, navedene fenolne kiseline iskazale su inhibirajući učinak prema ambroziji tek kod primjene 8 do 16 puta većih koncentracija nego što su prirodno prisutne u biljnim tkivima. Pozitivno je to što u tako visokim koncentracijama nisu inhibirale početni rast kukuruza. Međutim, osim na korovne i kultivirane vrste svakako bi trebalo istražiti ponašanje fenolnih spojeva u tako višim koncentracijama na mikrobiotu i faunu tla. Konkretnije, visoke koncentracije fenolnih spojeva ne bi smjele naštetiti brojnosti i raznolikosti bakterijskih zajednica i mikrobnih gljiva u rizosferi uzgajanih poljoprivrednih kultura, kao ni korisnoj entomofauni tla (pr. trčci) koji su pokazatelji biološke stabilnosti poljoprivrednih staništa.

Rezultati ovih istraživanja potvrđuju poznatu činjenicu da se učinkovito suzbijanje korova rijetko može postići samostalnom primjenom bilo koje alternativne mjere, pa tako i primjenom bioherbicide, bilo da se radi o sjetvi pokrovnih usjeva ili folijarnoj primjeni navedenih spojeva. Gotovo svi istraživači koji se bave ovom tematikom zaključuju isto, a to je obvezna integracija alternativnih mjera s drugim mjerama, najčešće s primjenom herbicide.

Jedna od mogućnosti je kombinacija inhibitornih fenolnih kiselina sa značajno reduciranim dozama sintetičkih herbicide koja, prema našim spoznajama, dosad nije istraživana. Međutim, postoje istraživanja u kojima su korovi u pšenici suzbijani s reduciranim dozama herbicide u kombinaciji s vodenim ekstraktima biljaka (sirka i suncokreta). Također, istraživan je učinak reduciranih dozacija herbicide s vodenim ekstraktima iz biljaka ambrozije i trnovite dikice (*Xanthium strumarium* L.) na korovne vrste. U oba slučaja autori navode dobar učinak na korove primjenom polovične ili $\frac{3}{4}$ doze herbicide od registrirane.

U sklopu doktorske disertacije provode se na Zavodu za herbologiju istraživanja u kojima se selektirani fenolni spojevi miješaju s reduciranim dozama herbicide. Preliminarni rezultati obećavajući su, i u pojedinim se slučajevima zadovoljavajući učinak na ambroziju i koštan postigao i primjenom osam puta manje doze herbicide od preporučene u tank-mixu sa selektiranim fenolnim spojevima. Ipak, rezultati ovih istraživanja ukazuju da učinak reduciranih dozacija herbicide značajno ovisi o vrsti herbicide, ali i o vrsti fenolnog spoja koji se dodaje u tank-miks. Osim toga, početna *in vitro* istraživanja potrebno je proširiti i na istraživanja u plasteniku, a potom i u poljskim uvjetima gdje učinak herbicide značajno varira u ovisnosti o brojnim biotičkim i abiotičkim čimbenicima.

ZAKLJUČAK

Zbog ekotoksikološki povoljnih karakteristika te manjeg rizika od razvoja rezistentnih populacija korova, sekundarni metaboliti biljaka (alelokemikalije) služe kao dobri kandidati za razvoj bioherbicide. Unatoč svim prednostima

bioherbicida, njihova primjena često je manje prikladna od trenutačnih sintetičkih herbicida, pogotovo u poljskim uvjetima. Kratka perzistentnost, različita koncentracija alelokemikalija u biljnim vrstama u ovisnosti o ekološkim uvjetima te njihova cijena glavni su razlozi ograničene primjene u poljoprivredi. U postojećim uvjetima realnija je opcija kombinacija bioherbicida s drugim mjerama suzbijanja korova, ponajprije s primjenom reduciranih doza herbicida. Ipak, brojne prednosti ekotoksikološki prihvatljivih sredstava nameću potrebu da se i dalje u znanstvenim, a i komercijalnim krugovima, istražuju/razvijaju ti spojevi. Svakako naglasak treba staviti na unapređenje formulacije bioherbicidnih aktivnih tvari, što je ključni čimbenik koji utječe na učinkovitost bioherbicidnog proizvoda. Također, istraživanjima je potrebno izolirati i identificirati nove alelopatske spojeve – bioherbicide iz potencijalnih donorskih biljnih vrsta (npr. invazivni korovi) koje bi kemijska industrija mogla sintetizirati u obliku prihvatljivu za primjenu u poljoprivrednoj proizvodnji. I, zaključno, potrebno je više biomolekularnih studija kako bi se detaljno razjasnio mehanizam biološke interakcije između korova i bioherbicida s ciljem lakšeg i bržeg razvoja te primjene bioherbicida u široj poljoprivrednoj proizvodnji.

LITERATURA

Oerke, E.C. (2006.). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*. 44(1):31 – 43

Barić, K., Ostojić, Z. (2020.). Implementacija pokrovnih usjeva u sustav suzbijanja korova. *Glasilo biljne zaštite*. 20 (5):530-539

Barić, K., Svečnjak, Z., Lakić, J., Pintar, A., Torić, T. (2020.). Učinak pokrovne kulture na kontrolu korova na strništu. *Zbornik radova 55. Hrvatski i 15. Međunarodni simpozij agronoma*, str. 255-259.

Šćepanović, M., Šoštarčić, V., Pinar, A., Lakić, J., Barić K. (2020.). Pojava rezistentnih populacija korova na herbicide inhibitore acetolaktat-sintaze u Republici Hrvatskoj. *Glasilo biljne zaštite* 20 (6): 628-640

Šćepanović, M., Sarić-Krsmanović, M., Šoštarčić, V., Brijačak, E., Lakić, J., Trifunović-Špirović, B., Umiljendić Gajić, J., Radivojević, Lj. (2021.). Inhibitory Effects of Brassicaceae Cover Crop on *Ambrosia artemisiifolia* Germination and Early Growth, *Plants-Basel*, 10 (4): 794

Brijacac, E., Koscak, L., Sostarcic, V., Kljak, K., Scepanovic, M. (2020.). Sensitivity of yellow foxtail (*Setaria glauca* L.) and barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L.) to aqueous extracts or dry biomass of cover crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 100 (15) 5510-5517

Stručni rad