

## OTPORNOST KOROVSKIH POPULACIJA U VOĆNJACIMA NA GLIFOSAT

IRENA KRGA<sup>1</sup>, DANIJELA PAVLOVIĆ<sup>2</sup>, ANA ANĐELKOVIĆ<sup>3</sup>, SANJA ĐUROVIĆ<sup>2</sup>,  
DRAGANA MARISAVLJEVIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd

<sup>2</sup>Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd,

<sup>3</sup>Stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije  
e-mail: dulekaca@yahoo.com

### REZIME

Danas, u Svetu i kod nas, za suzbijanje korova u voćnjacima najviše se koriste herbicidi na bazi glifosata, glufosinat-amonijuma, dikvata i drugi. Intenzivna primena glifosata uticala je na pojavu rezistentnih korovskih vrsta što za posledicu ima smanjenu efikasnost. U našoj zemlji površine pod voćnim zasadima iznose 224 hiljade hektara što svakako ukazuje na veliku upotrebu herbicida i mogućnost da je došlo do razvoja rezistentnih populacija korova. Zbog toga su sakupljana semena nekoliko korovskih vrsta sa površina gde je bila višegodišnja intenzivna primena glifosata u voćnjacima (Indija, Brestovac, Šabac, Vršac, Sombor, Glogonjski Rit, Padinska Skela, Kosančić i Surčin). Biljke su gajene u kontrolisanim uslovima i na otvorenom polju. Biljni materijal je nakon uzorkovanja usitnjen u tečnom azotu i ekstrakcija šikiminske kiseline je urađena pomoću hlorovodonične kiseline (1 g biljnog materijala + 5 ml 1M HCL). Nakon 24 h očitavan je sadržaj šikiminske kiseline na tečnom hromatografu (HPLC). Analiza dobijenih rezultata je pokazala da su vrste *Amaranthus retroflexus* (lok. Šabac), *Abutilon theophrasti* (lok. Brestovac) i korovski *Helianthus annuus* (lok. G. Rit) razvile određeni stepen rezistentnosti prema glifosatu.

**Cljučne reči:** korovi, rezistentnost, šikiminska kiselina, voćnjak

### UVOD

Prisustvo korova u voćnjacima može uticati na rast stabala, početak i intenzitet cvetanja, prinos i kvalitet voća, kao i otpornost biljaka na niske zimske temperature (Majek i sar., 1993). Isti autori navode da je jako mali broj biljaka *Amaranthus hybridus* (2 biljke na 0,9 m<sup>2</sup>) uticao na rast voćaka i njihovo plodonošenje. Zbog toga se obavlja monitoring korovskih populacija i definiše strategija za njihovu kontrolu. Brza i blagovremena detekcija neefikasnog delovanja herbicida ključni je faktor da se izbegne finansijski problem (Burgos i sar., 2013). Danas, kao i mnogo decenija unazad u Svetu i kod nas, za suzbijanje korova u voćnjacima najviše se koriste herbicidi na bazi glifosata, parakvata, oksifluorfena, dikvata i drugi. Glifosat je neselektivni herbicid, širokog spektra delovanja, koji se primenjuje globalno, usled velike efikasnosti i ekonomičnosti u kontroli širokog spektra korova u razno-

vršnim poljoprivrednim uslovima (Baylis, 2000). Ovaj herbicid je, od momenta uvođenja u poljoprivredu od strane Monsanta 70-ih godina prošlog veka, transformisao poljoprivrednu proizvodnju (Baylis, 2000). Tokom prvih godina upotrebe nije bilo registrovanih slučajeva rezistentnosti i smatralo se malo verovatnim da će doći do evolucije vrsta rezistentnih na ovaj herbicid (Bradshaw i sar., 1997), međutim usled intenzivne primene glifosata došlo je do razvoja rezistentnosti kod nekoliko korovskih vrsta (Koger i sar., 2004). Danas je širom sveta registrovano više od 20 takvih vrsta (Heap, 2013). Većina registrovanih rezistentnih korovskih populacija razvila se u voćnjacima ili vinogradima i usevima tolerantnim na glifosat (Sansom i sar., 2013). Danas se smatra da je vrsta *Conyza canadensis* najšire rasprostranjena rezistentna vrsta sa registrovanim rezistentnim populacijama u Brazilu, Kini, Španiji i Češkoj (Nol i sar., 2012; Heap, 2013). Smanjena efikasnost glifosata na ovu vrstu u uslovima

voćnjaka zabeležena je u Grčkoj (Giannopolitis i sar., 2008). Prema nekim istraživanjima smatra se da su svi zabeleženi slučajevi rezistencije korovskih vrsta roda *Conyza* (*Conyza bonariensis* i *Conyza sumatrensis*) bili registrovani u uslovima voćnjaka i vinograda. Do razvoja rezistentnosti je došlo usled upotrebe suboptimalnih doza glifosata, neadekvatnog vremena primene i loše tehnike primene herbicida (Sansom i sar., 2013). U našoj zemlji proizvodnja voća je značajna jer postoje izvanredne mogućnosti za uspevanje gotovo svih voćnih vrsta. Površine pod voćnim zasadima iznose 224 hiljade hektara što svakako ukazuje na veliku upotrebu herbicida. Prema podacima Ministarstva poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstava RS za 2008. godinu, od ukupno uvezene količine herbicida (177,47 t) na glifosat otpada preko 20% (40 t) (www.mpt.gov.rs). Glifosat ostvaruje dejstvo na korove tako što inhibira biosintezu aromatičnih amino kiselina, time dovodeći do nekoliko metaboličkih poremećaja u funkcionisanju biljke (inhibicija proteinske aktivnosti i biosinteze sekundarnih produkata metabolizma) (Franz i sar., 1997) i narušava „put“ šikiminske kiseline (Duke i sar., 2003). Primarno mesto delovanja je enzim 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintaze (EPSPS) (*Steinrucken i Amrhein, 1980*). Ovaj enzim je uključen u biosintezu aromatičnih amino kiselina (triptofan, fenilalanin i tirozin) preko „puta“ šikiminske kiseline (Gressel, 2002). Uočeno je da kod osetljivih biljaka usled inhibicije EPSP sintaze glifosatom dolazi do uvećanja sadržaja šikiminske kiseline (Franz i sar., 1997; Hollander-Czytlo i Amrhein, 1983; Mollenhauer i sar., 1987; Lydon i Duke, 1988) što omogućava brzu detekciju rezistentnih vrsta korova na glifosat (Feng i sar., 2004; Koger i Reddy, 2005; Mueller i sar., 2003).

Cilj ovih istraživanja je bio da se proverí efikasnost glifosata u suzbijanju nekih korovskih vrsta u voćnjacima na teritoriji Srbije. Dobijeni odgovori o prisustvu rezistentnih korova putem brze i pouzdane metode mogu olakšati strategiju borbe sa prisutnim korovskim vrstama u voćnjacima.

## MATERIJAL I METODE

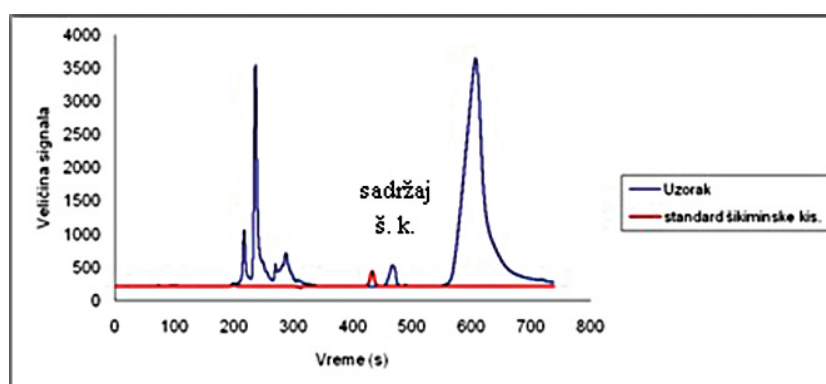
Seme korova (*Amaranthus retroflexus*, *Abutilon theophrasti*, *Ambrosia artemisiifolia*, *A. trifida*, *Avena fatua*, *Helianthus annuus* var. *ruderalis* i *Sorghum halepense*) je sakupljano u periodu Septembar-Oktobar 2010-2012 god. u voćnjacima, na teritoriji Srbije, sa dugom istorijom primene herbicida na bazi glifosata. Seme je do analize čuvano na temperaturi  $T=10-15^{\circ}\text{C}$ . Eksperimenti su urađeni u kontrolisanim uslovima u laboratoriji i delom na otvorenom prostoru (uslovi polja). Seme je sejano u saksije zapremine 0,5 L i čuvano u fitotronu (fotoperiod  $12^{\text{h}}/12^{\text{h}}$ , temperatu-

ra  $24^{\circ}\text{C}$ , vlažnost 60 %) do pojave klijanaca. Biljke su nakon toga čuvane na otvorenom prostoru i zalivane po potrebi. Primena herbicida Glifosav 480 SL (aktivna materija: glifosat,  $480\text{ g L}^{-1}$ ) u količini od  $4\text{ L ha}^{-1}$  je urađena kada su širokolisni korovi bili u fazi 4-6 listova, odnosno travni visine 15-20 cm. Uzorkovanje biljnog materijala (5 biljaka po tretmanu od svake biljne vrste) je obavljeno 2, 4 i 6 dana posle primene (DPP) herbicida. Biljni materijal je čuvan u zamrzivaču ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) do analize sadržaja šikiminske kiseline. Sadržaj šikiminske kiseline je određivan prema metodi Mueller i sar., 2003. Biljni materijal je usitnjen u tečnom azotu pomoću tučka i avana. Usitnjenom materijalu u količini 1 g je dodavana hlorovodonična kiselina 5 ml 1M HCL i mućkan je na šejkeru (100 rpm) 24 h. Nakon ekstrakcije šikiminske kiseline uzorci su profiltrirani i rastvoru je podešena pH vrednost na 3-3,5 sa 1M i 0,05M NaOH. Uzorcima (5 ml) je dodavan acetonitril (1 ml), urađeno je filtriranje na filteru od  $4,5\text{ }\mu\text{m}$  i filtrat je čuvan u frižideru na  $4^{\circ}\text{C}$  do analize. Merenje sadržaja šikiminske kiseline je urađeno na tečnom hromatografu HPLC (Hewlett Packard 1050 series, DAD (Diode Arrey Detector), Luna- NH2 kolona prečnika  $5\text{ }\mu\text{m}$ , protok  $1\text{ ml min}^{-1}$ ). Na osnovu dobijenih hromatograma tj. vrednosti površine i visine pika standarda šikiminske kiseline i ispitivanih uzoraka, izračunate su vrednosti ove kiseline u svakom uzorku i izražene u ppm (Grafik 1).

## REZULTATI I DISKUSIJA

Analiza dobijenih rezultata je pokazala da su populacije vrsta *A. retroflexus* (sa lok. Šabac), *Abutilon theophrasti* (sa lok. Brestovac) i korovskog *H. annuus* (sa lok. Glogonjski Rit) ispoljile izvesnu otpornost prema glifosatu. Uočen je trend blagog variranja i porasta sadržaja šikiminske kiseline, međutim vrednosti nisu bile mnogo veće od izmerenih u netretiranim biljkama. Analiza varijanse je potvrdila da se izmereni sadržaj šikiminske kiseline 6 DPP nije statistički značajno razlikovao od sadržaja izmerenog u kontrolnim biljkama (Tabela 1).

Konstatovana variranja 2 i 4 DPP (kod *A. retroflexus* 2 DPP 10.35 ppm i 4 DPP 16.093 ppm; kod *A. theophrasti* 2 DPP 3.121 ppm i 4 DPP 3.423 ppm i kod *H. annuus* 2 DPP 21.161 ppm i 4 DPP 12.697 ppm) ukazuju da su tretirane biljke pretrpele izvestan šok nakon primene herbicida ali su se aktiviranjem odbrambenih mehanizama oporavile (Grafik 2, 3 i 5). Nekada biljke reaguju tako što trenutno uvećaju količinu EPSPS ili pojačaju njenu aktivnost (Baerson i sar., 2002; Feng i sar., 1999). Takođe, ova trenutna slabost biljaka se može dovesti u vezu sa činjenicom da pored rezistentne forme EPSPS enzima u biljci je



**Grafikon 1.** Hromatogram šikiminske kiseline, standard i uzorak.  
**Graph 1.** Chromatogram of shikimic acid, standard and sample.

**Tabela 1.** Značajnost razlika u sadržaju šikiminske kiseline između kontrolnih i tretiranih biljaka korova nakon primene glifosata (LSD test).

**Table 1.** The significance of differences in the content of shikimic acid between control and treated weed plants after glyphosate treatment (LSD test).

Korovi Weeds	Lokalitet Locality	Nivo statističke značajnosti razlika The level of statistically significant differences		
		K-2 DPP	K-4 DPP	K-6 DPP
<i>Amaranthus retroflexus</i>	Šabac	0.00000***	0.00001***	0.324NS
<i>Amaranthus retroflexus</i>	Indija	0.023**	0.0001***	0.0000***
<i>Abutilon theophrasti</i>	Brestovac	0.041*	0.022*	0.315NS
<i>Abutilon theophrasti</i>	Glogonjski Rit	0.0038***	0.021*	0.00077***
<i>Helianthus annuus</i> var. <i>ruderalis</i>	Glogonjski Rit	0.011**	0.000035***	0.051NS
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Glogonjski Rit	0.00018***	0.852NS	0.0000***
<i>Ambrosia trifida</i>	Kosančić	0.155NS	0.0003***	0.00004***
<i>Avena fatua</i>	Radmilovac	0.000064***	0.001***	0.0000***
<i>Sorghum halepense</i>	Padinska Skela	0.000001***	0.000003***	0.000001***

DPP-dani nakon tretmana; NS-razlike nisu statistički značajne;  $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$ ;  $p < 0,001^{***}$ ; LSD test  
 DPP- days after treatment; NS-differences are not statistically significant;  $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$ ;  $p < 0,001^{***}$ ; LSD test

prisutna i izvesna količina osetljive forme (Bourque i sar., 2002) ili je možda došlo do „parcijalnog isključivanja glifosata“ iz plastida čime se smanjuje njegov efekat na EPSPS (Feng i sar., 2004). Baerson i saradnici (2002) su izmereni visok početni nivo šikiminske kiseline kod biljaka *L. rigidum* (10x veći nego kod kontrole) objasnili pojačanom aktivnošću biljke da prevaziđe stanje stresa nastalo primenom glifosata.

Blaga tendencija nakupljanja šikiminske kiseline ( $b=0,073$ ) kod biljaka vrste *H. annuus* nam uka-

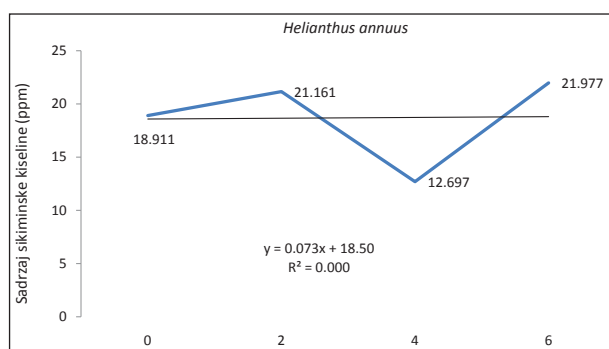
zuje na rezistentnost ove vrste prema glifosatu. Takođe, činjenica da nema statistički značajnih razlika u sadržaju šikiminske kiseline između tretiranih biljaka (6 DPP) i kontrole potvrđuje rezistentnost ove vrste (Grafik 2; Tabela 1).

Kod populacije *A. retroflexus* sa lokaliteta Indija uočava se osetljivost na glifosat, jer je sadržaj šikiminske kiseline u funkciji vremena pokazao jasnu tendenciju nakupljanja (Grafik 4).

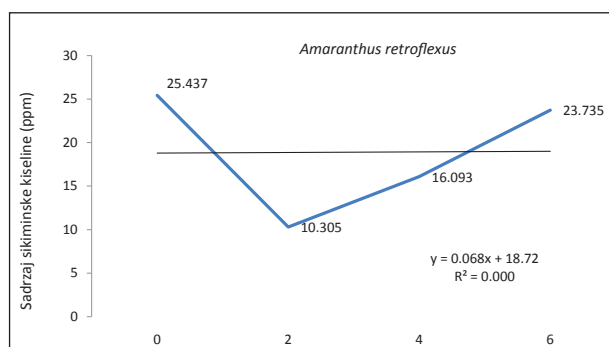
Takav trend je konstatovan i kod populacije *A. theophrasti* sa lokaliteta Glogonjski Rit (Grafik 6).



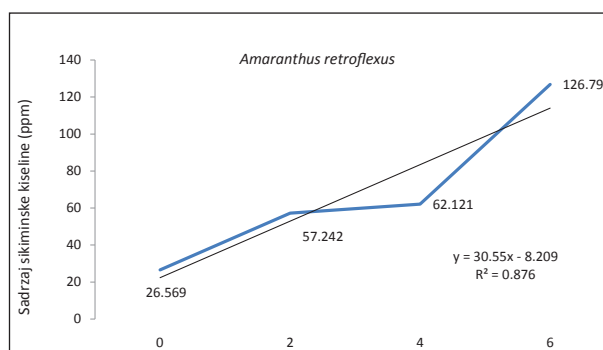
**Slika 1.** Ogled sa biljkama *A. fatua*.  
**Figure 1.** Experiment with *A. fatua* plants.



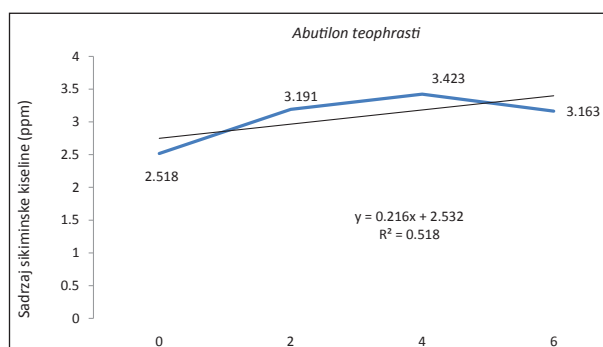
**Grafikon 2.** Sadržaj šikiminske kiseline posle primene 4L ha<sup>-1</sup> glifosata kod *H. annuus* (lok. G. Rit).  
**Graph 2.** Shikimate content after 4 L ha<sup>-1</sup> glyphosate of *H. annuus* (loc. G. Rit).



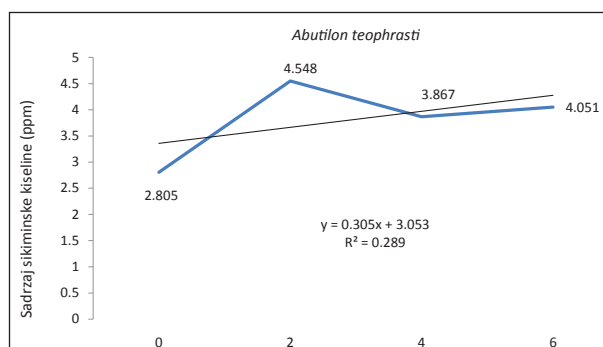
**Grafikon 3.** Sadržaj šikiminske kiseline posle primene 4 L ha<sup>-1</sup> glifosata kod *A. retroflexus* (lok. Šabac).  
**Graph 3.** Shikimate content after 4 L ha<sup>-1</sup> glyphosate of *A. retroflexus* (loc. Šabac).



**Grafikon 4.** Sadržaj šikiminske kiseline posle primene 4 L ha<sup>-1</sup> glifosata kod *A. retroflexus* (lok. Indija).  
**Graph 4.** Shikimate content after 4 L ha<sup>-1</sup> glyphosate of *A. retroflexus* (loc. Indija).



**Grafikon 5.** Sadržaj šikiminske kiseline posle primene 4 L ha<sup>-1</sup> glifosata kod *A. theophrasti* (lok. Brestovac).  
**Graph 5.** Shikimate content after 4 L ha<sup>-1</sup> glyphosate of *A. theophrasti* (loc. Brestovac).



**Grafikon 6.** Sadržaj šikiminske kiseline posle primene 4 L ha<sup>-1</sup> glifosata kod *A. theophrasti* (lok. G. Rit).  
**Graph 6.** Shikimate content after 4 L ha<sup>-1</sup> glyphosate of *A. theophrasti* (loc. G. Rit).

U toku prvih šest dana nakon primene glifosata uočena je tendencija porasta sadržaja u odnosu na kontrolu ( $b=0,305$ ), pri čemu je maksimum (4.548 ppm) zabeležen već drugog dana nakon primene herbicida (Grafik 6). Ovakav trend reakcije biljaka na primenu glifosata ukazuje da su biljke pokušale da prežive stres aktivnim metabolizmom, pa je četvrtog dana nakon primene herbicida uočen određeni pad (3.867 ppm) u sadržaju šikiminske kiseline u odnosu na prethodno merenje (2 DPP). Međutim, šestog dana nakon primene glifosata uočen je ponovni rast sadržaja (4.051 ppm) šikiminske kiseline, koji ukazuje na to da je ispitivana populacija osetljiva na glifosat.

Sadržaj šikiminske kiseline u tretiranim biljkama *A. artemisiifolia* tokom vremena ispitivanja takođe pokazuje trend rasta, kao i izraženu osetljivost biljaka na glifosat (Grafik 7). Sadržaj šikiminske kiseline izmeren drugog dana je bio 1.9x, četvrtog 1.1x i šestog dana 3.4x veći nakon primene glifosata u poređenju sa vrednostima izmerenim u kontroli. Smanjenje u koncentraciji šikiminske kiseline u biljkama 4 DPP (128.567 ppm) ukazuje na pokušaj biljaka da se vrata u normalno stanje nakon stresa izazvanog primenom herbicida. Međutim, vrednosti sadržaja kiseline u biljkama 6 DPP (395.822 ppm), pokazuju da one u tome nisu uspele. Obrada podataka analizom varijanse potvrđuje statistički značajne razlike u sadržaju šikiminske kiseline između kontrole i tretiranih biljaka 6 DPP (Tabela 1). Činjenica da se biosinteza aromatičnih aminokiselina odvija preko puta šikiminske kiseline (Gressel, 2002) i da bez njih nema sinteze belančevina (Devine i sar., 1993), odnosno rasta biljaka objašnjava zašto su biljke *A. artemisiifolia* i *A. trifida* propale 17 dana nakon primene glifosata. Nakupljena šikiminska kiselina ukazuje na to da se glifosat vezao za enzim EPSPS i da je zbog toga došlo do nakupljanja šikiminske kiseline.

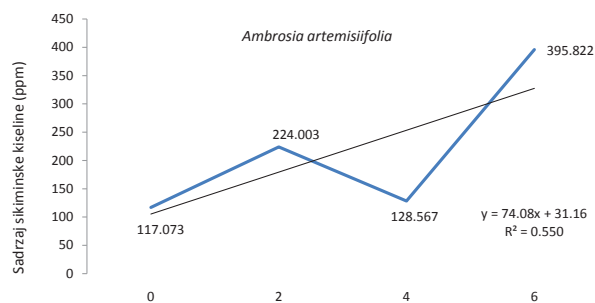
Kod vrste *A. trifida* promene u sadržaju šikiminske kiseline su bile još izraženije ( $b=287,3$ ), tako da je izmereni sadržaj šestog dana bio 18,7x veći (Grafik 8). Maksimalni sadržaj šikiminske kiseline kod obe vrste je zabeležen šestog dana nakon primene glifosata (395.822 ppm, odnosno 893.667 ppm).

Kod ispitivanih travnih vrsta postoji jasna tendencija nakupljnja šikiminske kiseline (Grafik 9 i 10). Konstatovana variranja količine šikiminske kiseline uočena 4 DPP kod *A. fatua* (izmere-

ni sadržaj 10.845 ppm) i 2 DPP kod *S. halepense* (izmereni sadržaj 98.241 ppm) opet potvrđuju činjenicu da biljka putem metabolizma ili drugih mehanizama pokušava da prevaziđe stanje stresa nastalo primenom herbicida. Međutim, značajno visok sadržaj šikiminske kiseline kod obe ispitivane vrste šestog dana posle primene glifosata (3x kod *A. fatua* (Slika 1) i 1.97x veći sadržaj kod *S. halepense* u odnosu na kontrolu) potvrđuje njihovu osetljivost na glifosat.

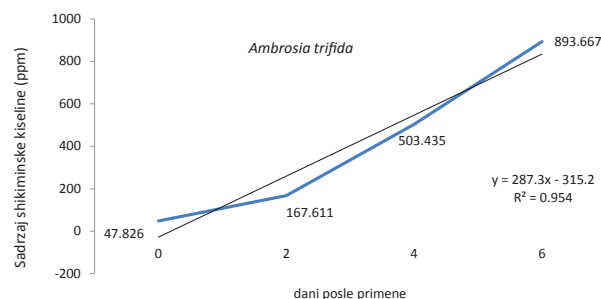
Brojni faktori mogu uticati na sadržaj šikiminske kiseline: veličina lisne površine (Shaner i sar., 2005), vreme uzorkovanja (Henry i sar., 2005), fenofaza razvoja biljaka (Dinelli i sar., 2006), ali isto tako njen sadržaj ne zavisi od toga da li je biljka rezistentna ili osetljiva na herbicid (Pavlović, 2010), da li je tkivo zelene ili braon (nekrotirano) boje (Singh i Shaner, 1998), starosti biljaka (Singh i Shaner, 1998) i drugih uticaja. Henry i saradnici (2007) su ukazali na činjenicu da je sadržaj šikiminske kiseline u korelaciji sa veličinom lisne površine. U vezi sa ovim oni su potvrdili veći sadržaj šikiminske kiseline posle primene glifosata u tkivu biljaka suncokreta nasuprot sadržaju izmerenom u tkivu pšenice i prosa. U našim eksperimentima ova činjenica nije potvrđena.

Glifosat je sporo-aktivan herbicid, što znači da je potrebno više dana dok se ne pojave prvi simptomi, a biljka propada tek za 10–20 dana. Vizuelni simptomi oštećenja mogu biti veoma slični simptomima nastalim usled delovanja herbicida iz grupe Acetil CoA karboksilaze i Acetolaktat sintetaze (Singh i Shaner, 1998). Upravo zbog ovih činjenica, primena metode merenja sadržaja šikiminske kiseline omogućava brzo utvrđivanje rezistentnosti korova na glifosat, odnosno ocenu efikasnosti primenjenog glifosata i dobru strategiju dalje kontrole korova. Suzbijanje korova u voćnjacima je značajan korak za dobru i efikasnu proizvodnju, jer su korovi domaćini brojnim patogenima, utiču na mikroklimu u zasadima, konkurenti su voćkama za hranljive materije i drugo (Welker i Glen, 1988, 1990; Belding i sar., 2004; Miller, 1983) te je zbog toga važan ozbiljan pristup menadžmentu o korovima. Zbog široke primene glifosata u otpornim usevima (GMO), voćnjacima, vinogradima, strništu i nepoljoprivrednim površinama i njegove dobre efikasnosti u primeni na širok spektar korova, treba ga sačuvati (Padgett i sar., 1996; Powles i Preston, 2006).



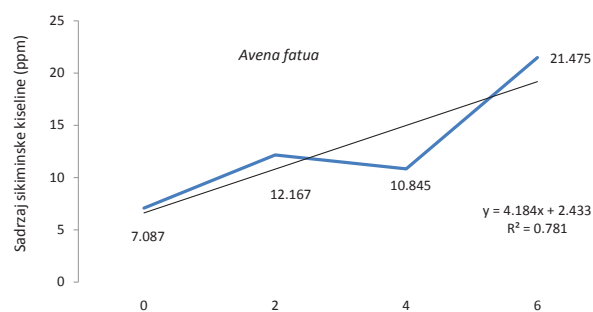
**Grafikon 7.** Sadržaj šikiminske kiseline posle primene 4 L ha<sup>-1</sup> glifosata kod *A. artemisiifolia* (lok. G. Rit).

**Graph 7.** Shikimate content after 4 L ha<sup>-1</sup> glyphosate of *A. artemisiifolia* (loc. G. Rit).



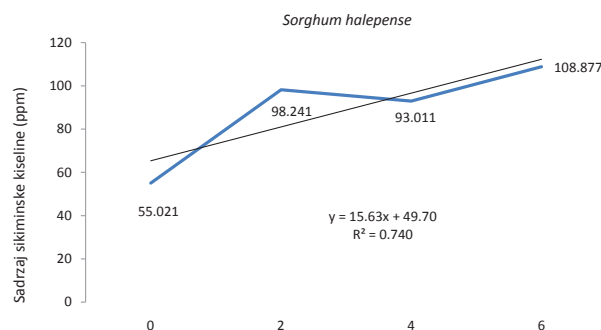
**Grafikon 8.** Sadržaj šikiminske kiseline posle primene 4 L ha<sup>-1</sup> glifosata kod *A. trifida* (lok. Kosačić).

**Graph 8.** Shikimate content after 4 L ha<sup>-1</sup> glyphosate of *A. trifida* (loc. Kosačić).



**Grafikon 9.** Sadržaj šikiminske kiseline posle primene 4 L ha<sup>-1</sup> glifosata kod *A. fatua* (lok. Radmilovac).

**Graph 9.** Shikimate content after 4 L ha<sup>-1</sup> glyphosate of *A. fatua* (loc. Radmilovac).



**Grafikon 10.** Sadržaj šikiminske kiseline posle primene 4 L ha<sup>-1</sup> glifosata kod *S. halepense* (lok. Padinska Skela).

**Graph 10.** Shikimate content after 4 L ha<sup>-1</sup> glyphosate of *S. halepense* (loc. Padinska Skela).

## ZAHVALNICA

Zahvaljujemo se Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS na finansijskoj podršci prilikom izvođenja ovih istraživanja (Projekat TR 31018).

## LITERATURA

Baylis, A.D. (2000): Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest. Manag. Sci.*, 56: 299–308.

Bradshaw, L.D., Padgett, S.R., Kimball, S.L., Wells, B.H. (1997): Perspectives on glyphosate resistance. *Weed Technol.*, 11: 189–198.

Belding, D.R., Majek, A.B., Lokaj, R.W.G., Hammerstedt, J., Ayeni, O.A. (2004): Orchard floor management influence on summer annual weeds and young peach tree performance. *Weed Technol.*, 18: 215–222.

Burgos, N.R., Tranel, P.J., Streibig, J.C., Davis, V.M., Shaner, D., Norsworthy, J.K., Ritz, C. (2013): Review: Confirmation of Resistance to Herbicides and Evaluation of Resistance Levels. *Weed Sci.*, 61(1): 4–20.

Bourque, J., Chen, Y. S., Heck, G., Humbeier, C., Reynolds, T., Tran, M., Ratliff, P. G., Sammans, D. (2002): In-

vestigation into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): resistance mechanism studies. Abstr. Weed Sci. Soc. Am., 42: 65.

Baerson, S. R., Rodriguez, D.J., Biest, N. A., Tran, M., You, J., Kreuger, R. W., Dill, G. M. (2002): Investigation the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Science*, 50: 721-730.

Duke, S.O., Baerson, S.R., Rimando, A.M. (2003): Herbicides: Glyphosate. In *Encyclopedia of Agrochemicals* (Plimmer, J.R., Gammon, D.W., Ragsdale, N.N., eds.), Wiley, New York.

Devine, M. D., Hall, J. C., Romano, M. L., Marles, M. A. S. (1993): Diclofop and fenoxaprop resistance in wild oat is associated with an altered effect on the plasm membrane electrogenic potential. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 45: 167-177.

Dinelli, G., Marotti, I., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P., Barnes, J. (2006): Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86(1): 30.

Franz, J.E., Mao, M.K., Sikorski, J.A. (1997): *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*. ACS Monograph 189, American Chemical Society, Washington, DC, 653.

Feng, P. C. C., Tran, M., Chiu, T., Sammons, R. D., Heck, G. R., CaJacob, C. A. (2004): Investigations into glyphosate resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, absorption and metabolism. *Weed Science*, 52: 498-505.

Feng, P. C. C., Pratley, J. E., Bohn, J. A. (1999): Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. II Uptake, absorption and metabolism. *Weed Science*, 51: 443-415.

Giannopolitis, C.N., Travlos, I., Chachalis, D., Papageorgiou, J., Kazantzidou, A. (2008): Investigation of resistance to glyphosate in *Conyza* biotypes from Greece. In: *Abstracts 2008 15th Hellenic Weed Science Conference* (11-12 December, Thessaloniki, Greece), 44 (in Greek). Weed Science Society of Greece.

Gressel M.J. (2002): *Molecular biology of weed control*. Taylor and Francis, London, 169.

Heap, I. (2013): International survey of herbicide resistant weed, [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org).

Henry, W. B., Koger, C. H., Shaner, D. L. (2007): Shikimate accumulation in sunflower, wheat and proso millet after glyphosate application. *Weed Science*, 55: 1-5.

Henry, W. B., Koger, C. H., Shaner, D. L. (2005): Accumulation of shikimate in corn and soybean exposed to various rates of glyphosate. *Crop. Manag.*, Doi 1094/CM-1123-01-RS.

Hollander-Czytko, H., Amrhein, N. (1983): Subcellular compartmentation of shikimic acid and phenylalanine in buckwheat cell suspension cultures grown in presence of shikimate pathway inhibitors. *Plant Science*, 29, 89-96.

Koger, C.H., Poston, D.H., Hayes, R.M., Montgomery, R.F. (2004): Glyphosate-Resistant Horseweed (*Conyza canadensis*) in Mississippi. *Weed Technology*, 18 (3): 820-825.

Koger, C.H., Reddy, K. N. (2005): Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science*, 53: 85-94.

Lydon, J., Duke, S. O. (1988): Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 813-818.

- Majek, B.A., Neary, P.E., Polk, D.F. (1993): Smooth pigweed interference in newly planted peach trees. *Journal of production agriculture*, 6(2): 244-246.
- Mueller, T.C., Massey, J.H., Hayes, R.M., Main, C.L., Stewart, C.N. (2003): Shikimate accumulation in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Crong.). *J. Agric. Food Chem.* 51: 680-684.
- Miller, S.S. (1983): Response of young „Topred Delicious“ apple trees to orchard floor management and fertilization (yield efficiency). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 108: 638-642.
- Mollenhauer, C., Smart, C.C., Amrhein, N. (1987): Glyphosate toxicity in the shoot apical region of the tomato plant. I. Plastid swelling is the initial ultrastructural feature following in vivo inhibition of 5-enolpyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 29, 55-35.
- Nol, N., Tsikou, D., Eid, M., Livieratos, I.C., Giannopolitis, C.N. (2012): Shikimate leaf disc assay for early detection of glyphosate resistance in *Conyza canadensis* and relative transcript levels of EPSPS and ABC transporter genes. *Weed Research*, 52: 233-241.
- Pavlović, D. (2010): Osetljivost biljaka na glifosat: Morfo-anatomski, fiziološki i biohemijski aspekt. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Padgett, S. R., Re, D. B., Barry, G. F., Eichholtz, D. E., Delannay, X., Fuchs, R. L., Kishore, G. M., Fraley, R. T. (1996): New weed control opportunities: Development of soybeans with roundap ready gene. In *Herbicide resistance crops: Agricultural, environmental, economic, regulatory and technical aspects* (Duk, S. O., ed.), CRC Press, Boca Raton, 53-84.
- Powles, B.S., Preston, C. (2006): Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Technology*, 20: 282-289.
- Sansom, M., Saborido, A.A., Dubois, M. (2013): Control of *Conyza* spp. with Glyphosate – A Review of the Situation in Europe. *Plant Protect. Sci.*, 49 (1): 44-53.
- Shaner, D. L., Nadler-Hassar, T., Henry, W. B., Koger, C. H. (2005): A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science*, 53: 769-774.
- Singh, B. K., Shaner, D. L. (1998): Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technology*, 12, 527-530.
- Steinrücken, H.C., Amrhein, N. (1980): The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 94, 1207-1212.
- Welker, W.V., Glenn, D.M. (1988): Growth response of young peach trees and changes in soil characteristics with sod and conventional planting systems. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 113: 652-656.
- Welker, W.V., Glenn, D.M. (1990): Peach tree growth as influenced by grass species used in a killed sod planting system. *Hort. Science*, 25: 514-515.
- www.mpt.gov.rs

**(Primljeno: 30.10.2013.)**  
**(Prihvaćeno: 26.11.2013.)**



## THE RESISTANCE OF ORCHARD WEED POPULATIONS TO GLYPHOSATE

IRENA KRGA<sup>1</sup>, DANIJELA PAVLOVIĆ<sup>2</sup>, ANA ANDELKOVIĆ<sup>3</sup>, SANJA ĐUROVIĆ<sup>2</sup>, DRAGANA MARISAVLJEVIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>University of Belgrade, Faculty of Biology, Belgrade

<sup>2</sup>Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

<sup>3</sup>Scholar of the Ministry of Education, Science and Technological Development  
of the Republic of Serbia  
e-mail: dulekaca@yahoo.com

### SUMMARY

Nowadays, both worldwide and in Serbia, for weed eradication in orchards mostly herbicides based on glyphosate, glufosinate-ammonium, diquat and others are used. Intensive glyphosate application has led to the development of resistant weed species, which has consequently resulted in a decrease in its effectiveness. In our country, areas under orchards amount to 224.000 hectares, which certainly points to a significant herbicide use and a possibility that weed resistant populations have developed. For this reason, seeds of several weed species from areas where glyphosate has been intensively used for years were collected (localities: Indjija, Brestovac, Šabac, Vršac, Sombor, Glogonjski Rit, Padinska Skela and Surčin). Plants were grown in controlled conditions and in the open field. Plant material was then crushed using liquid nitrogen, and the extraction of shikimic acid was performed using hydrochloric acid (1 g of plant material + 5 ml 1M HCl). 24 hours later the amount of shikimic acid was detected using high-pressure liquid chromatography. The analysis of the obtained results showed that species *Amaranthus retroflexus* (loc. Šabac), *Abutilon theophrasti* (loc. Brestovac) and wild *Helianthus annuus* (loc. G. Rit) have developed a certain degree of glyphosate resistance.

**Key words:** weeds, resistance, shikimate, orchard

(Received: 30.10.2013.)

(Accepted: 26.11.2013.)