

Pregledni rad  
Review Paper

UDK: 632.51+616-056]:632.954

## Rezistentnost korova na herbicide

### Stanje, uzroci nastanka i mogućnosti sprečavanja pojave rezistentnosti

Ibrahim Elezović, Dragana Božić i Sava Vrbničanić

*Poljoprivredni fakultet, Beograd - Zemun*

#### REZIME

Svaka biohemijska promena koja omogućava biljci da preživi herbicidni tretman može biti uzrok rezistentnosti. To znači da rezistentnost može nastupiti usled promene primarnog mesta delovanja (ciljanog mesta) herbicida, što dovodi do manjeg vezivanja herbicida, ili zbog preosetljivosti primarnog mesta delovanja. Takođe, rezistentnost se ispoljava i prilikom detoksikacije, zatim "zarobljavanja" herbicida, ili smanjenog usvajanja tako da manja količina herbicida dospe do ciljanog enzima. Na kraju, biljka može preživeti delovanje herbicida ukoliko raspolaže takvim metabolizmom koji će joj omogućiti da se zaštiti od produkovanih toksičnih komponenti nastalih u procesu aktivacije herbicida. Prvi slučajevi rezistentnosti korova na herbicide javili su se ubrzo posle uvođenja prvih herbicida. Tokom 70-ih godina kod većeg broja korovskih vrsta zabeležena je rezistentnost (*Amaranthus spp.*, *Chenopodium spp.*, *Erigeron canadensis*, *Kochia scoparia*, *Solanum nigrum*, *Panicum crus-galli*, *Senecio vulgaris*, *Poa annua*) na triazinske herbicide, kao i na herbicide iz drugih hemijskih grupa. Od 1987. godine do danas broj korovskih vrsta za koje je potvrđena rezistentnost na herbicide ALS inhibitore raste znatno brže nego broj novih vrsta rezistentnih na druge grupe herbicida. Za razliku od rezistentnosti na triazinske herbicide, rezistentnost na herbicide ALS inhibitore bazirana na primarnom mestu delovanja, može biti pripisana velikom broju različitih mesta gde se dešavaju mutacije. Naime, različite hemijske grupe herbicida koje inhibiraju ALS enzim imaju različita primarna mesta delovanja. Razlike su u supstituciji aminokiselina koje se dešavaju unutar regiona vezivanja. U stvari, šest različitih aminokiselina; alanin, arginin, glutamin, leucin, serin ili treonin mogu da zauzmu mesto prolinu 197 što dovodi do ispoljavanja rezistentnosti.

**Ključne reči:** korovi; herbicidi; ALS inhibitori; rezistentnost

#### UVOD

Rezistentnost korovskih biljaka na herbicide je tema koja sve češće privlači pažnju istraživača, zbog povećanja broja javljanja ovih slučajeva širom sveta, naročito u razvijenim zemljama evropskog i američkog kontinenta. Le Baron (1987, *cit.* Mallory-Smith i sar., 1990b) je rezistentnost korova na herbicide definisao kao mogućnost biotipa određene vrste da preživi količine herbicida, koje su za jedinke normalno osetljive populacije letalne.

Delovanje herbicida se zasniva na vezivanju ili interakciji supstance sa jednim ili više proteina iz čega proističe negativan uticaj na metabolizam ili rast biljke.

Delovanje herbicida se zasniva na vezivanju ili interakciji supstance sa jednim ili više proteina iz čega proističe negativan uticaj na metabolizam ili rast biljke.

---

Biljke mogu postati rezistentne na delovanje herbicida modifikacijom proteina koji redukuju ili eliminišu sposobnost herbicida da se vežu ili stupe u interakciju sa njim. U takvim slučajevima, rezistentnost je opisana kao otpornost ciljanog mesta (mesta delovanja herbicida). Alternativni tip ove vrste rezistentnosti je prekomerna sinteza proteina koji vezuje herbicid.

Pojava rezistentnosti korovskih vrsta na herbicide koji inhibiraju acetolaktat sintetazu (ALS) prvi put je utvrđena 1987. godine kod divlje salate (*Lactuca serriola* (L.) (Mallory-Smith i sar., 1990a) i metlevine (*Kochia scoparia* (L.) Schrad.) (Primiani i sar., 1990) u usevu ozime pšenice (*Triticum aestivum* L.) na površinama koje su pet uzastopnih godina tretirane navedenim herbicidima. Od tada do danas broj korovskih vrsta koje su razvile rezistentnost na ALS inhibitore je znatno brže rastao nego broj novih vrsta rezistentnih na triazine (grupu herbicida za koju je identifikovan prvi slučaj rezistentnosti, 1954 godine). Prema "Međunarodnom pregledu korova rezistentnih na herbicide", koji prati pojavu novih vrsta rezistentnih na herbicide u čitavom svetu, trenutno je zabeleženo da postoji 163 vrste rezistentne na ALS inhibitore (<http://www.weedscience.org/in.asp>).

Razvoj rezistentnosti korova na pojedine herbicide otežava njihovo suzbijanje, s jedne strane, i prouzrokuje znatne ekonomske gubitke, s druge strane. Zbog toga, istraživanja uzroka nastanka, mehanizama razvoja i metoda za detekciju rezistentnosti korova na herbicide, kao i osmišljavanje strategija za suzbijanje rezistentnih korovskih vrsta ima veliki naučni i praktični značaj. Poznavanje mehanizama razvoja rezistentnosti korovskih biljaka na ALS inhibitore predstavlja važan preduslov za detaljnija is-

traživanja i rešavanje ovog problema u praksi. Iako je veliki broj naučnika proučavao ovaj problem, još uvek postoje mnoge nepoznanice po pitanju genetičkih, biohemijskih i fizioloških osnova nastanka i razvoja rezistentnosti korovskih biljaka na herbicide. Za praćenje ove pojave neophodne su relevantne, precizne, brze i jeftine metode koje sa velikom tačnošću mogu da pruže odgovor na postavljeni zadatak, odnosno da li je dati biotip rezistentan ili ne.

S obzirom da je fenomen rezistentnosti korova na herbicide prvi put uočen za herbicide iz grupe triazina (Abel, 1954), metode za određivanje rezistentnih biotipova na ovu grupu su najbrojnije. Međutim, kako je u poslednjih desetak godina, problem rezistentnosti korova na ALS inhibitore globalno od većeg ekonomskog značaja, jer se herbicidi ALS inhibitori više primenjuju (Heap, 1999), sve veća pažnja se posvećuje metodama koje su pogodne za utvrđivanje i praćenje rezistentnosti korovskih vrsta na ovu grupu herbicida.

U ovom radu razmatraju se osnovna pitanja vezana za rezistentnost korovskih biljaka na ALS inhibitore, pri čemu je posebna pažnja usmerena na mehanizme nastanka i metode za detekciju rezistentnosti.

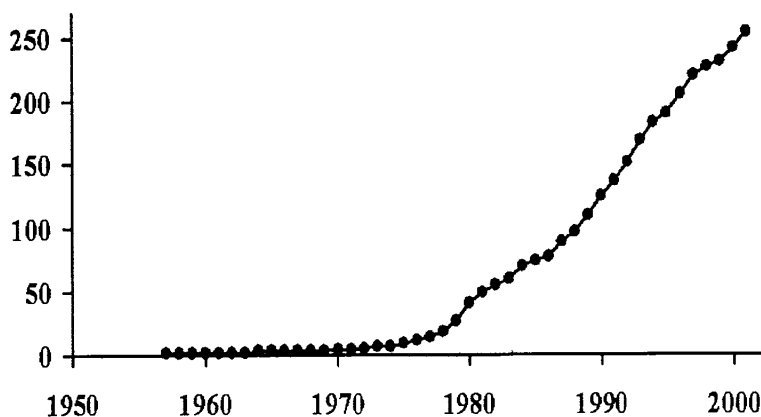
## RAZVOJ REZISTENTNOSTI KOROVSKIH BILJAKA NA HERBICIDE ALS INHIBITORE I UZROCI NASTANKA

Rezultati koji se odnose na ispitivanje rezistentnosti korova na herbicide prvi put su publikovani 1970. godine kada je korovska vrsta, krstica obična (*Senecio vulgaris* L.), preživela dozu od skoro 18 kg/ha atrazina (Rayan, 1970, cit. Norsworthy i sar., 1999). Do tada, neefi-

kasnost herbicida obično je pripisivana nepovoljnim uslovima sredine, primeni herbicida u neadekvatnoj fazi razvoja korovske vrste, kao i nedovoljno kvalitetnoj primeni herbicida.

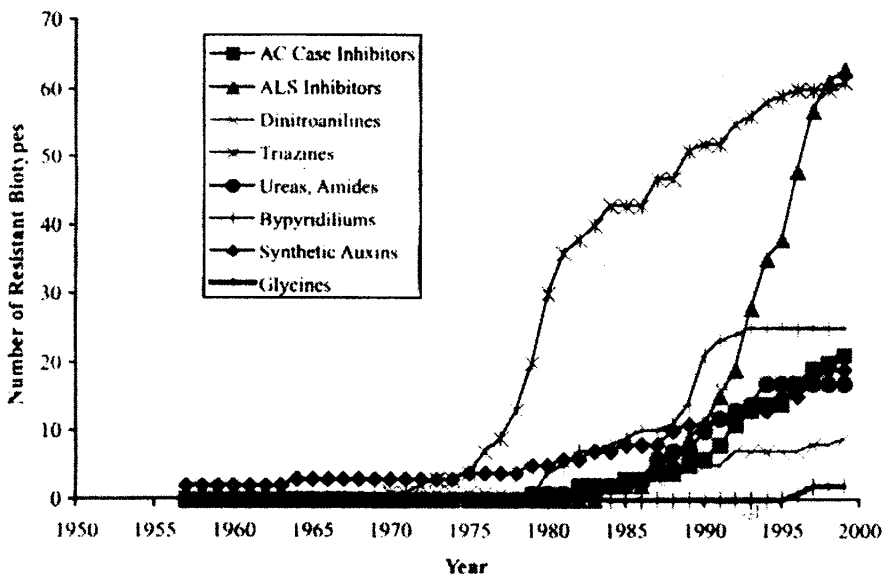
Dve decenije kasnije detektovan je prvi slučaj rezistentnosti korova na ALS inhibitore, što je razumljivo s obzirom da su ovi herbicidi uvedeni u upotrebu tek početkom devedesetih godina prošlog veka. Naime, 1987. postavljen je poljski ogled u usevu ozime pšenice, na površini gde je prethodne godine zapaženo da je metsulfuron ispoljio slab efekat u suzbijanju divlje salate (*Lactuca serriola* L.). Zaključak ovih ispitivanja je bio da su populacije ove korovske vrste rezistentne na mešavinu hlorsulfurona i metsulfurona (Mallory-Smith i sar., 1990a). Iste godine utvrđena je rezistentnost divlje metlevine (*Kochia scoparia* (L.) na ALS inhibitore (Primiani i sar., 1990). Rezi- stentne populacije, navedene dve korovske vrste, pronađene su na površinama sa ozimom pšenicom koje su pet uzastopnih godina tretirane herbicidima iz grupe sul- fonilurea.

Od 1987. godine do danas broj korovskih vrsta za koje je potvrđena rezistentnost na herbicide ALS inhibitore raste znatno brže nego broj novih vrsta rezistentnih na druge grupe herbicida (npr. inhibitore fotosinteze). U vezi s tim, u "Međunarodnom pregledu korova rezistentnih na herbicide", navedeno je da trenutno postoji 272 korovska biotipa, odnosno 163 vrste (98 dikotila i 65 monokotila) rezistentnih na herbicide, širom sveta, s tim što je najveći broj biotipova detektovan u Americi i Kanadi. Od toga, 64 biotipa su razvila rezistentnost na inhibitore fotosistema II, 79 na ALS inhibitore, 30 na inhibitore ACC-aze (acetyl koenzim A karboksilaza) (<http://weed-science.org/in.asp>). Povećanje broja rezistentnih biotipova u toku druge polovine XX veka, i povećanje broja rezistentnih biotipova na nekoliko grupa herbicida u istom periodu, prikazani su na slikama 1. i 2. Ovde je važno napomenuti da su inhibitori ALS i ACC-aze sada globalno od većeg ekonomskog značaja, i da je broj korovskih vrsta koje pokazuju rezistentnost na ove inhibitore, poslednje de-



Sl. 1. Hronološki prikaz povećanja broja korovskih vrsta rezistentnih na herbicide u svetu (<http://weedscience.org/in.asp>).

Fig. 1. The chronological increase in the number of herbicide-resistant weeds worldwide.



Sl. 2. Hronološki prikaz povećanja broja korovskih vrsta rezistentnih na nekoliko grupa herbicida (<http://weedscience.org/in.asp>).

Fig. 2. The chronological increase in the number of herbicide-resistant weeds for several herbicide classes.

cenije sve veći. Sve ovo ukazuje da je problem rezistentnosti korova na herbicide postao veoma akutan, što znači da su veoma važne strategije u praćenju, proučavanju i borbi protiv ove pojave u agroekosistemu.

Rezistentnost korovskih biljaka na herbicide postala je glavni problem u uslovima poljoprivredne proizvodnje sa uzastopnom primenom istih, ili herbicida istog mehanizma delovanja. Kao odgovor na tako jak selekциони pritisak, usled uzastopne primene herbicida sa istim mehanizmom delovanja, menja se genetički sastav korovskih populacija, tako što se povećava frekvencija rezistentnih alela i individua. Ponovnom primenom istog, ili herbicida istog mehanizma delovanja uništavaju se osetljive populacije, dok rezistentne preživljavaju, razmnožavaju se i prenose osobine rezistentnosti na sledeću generaciju. Powles

i Shaner (2001) ističu da će svaka poznata supstitucija amino kiselina unutar ALS enzima koja daje rezistentu populaciju biti nasleđena kao dominantna osobina.

Takođe, na razvoj rezistentnosti korova na herbicide utiče i perzistentnost herbicida u zemljištu. U vezi s tim, Gressel i saradnici (1991, *cit. Smit i sar., 2001*) su potvrdili da herbicidi koji duže perzistiraju u zemljištu imaju tendenciju da ubrzaju razvoj rezistentnosti. Zapaženo je da, herbicidi ALS inhibitori koji duže perzistiraju u zemljištu, onemogućavaju naknadno klijanje osetljivih biljaka, tako da one ne stupaju u konkurentne odnose sa rezistentnim individuumima. Lovell i saradnici (1996) ističu da korovi koji imaju veliku produkciju semena, zatim koji brzo klijanje i čije seme i polen se uspešno rasprostiru vetrom, imaju veću verovatnoću da razviju rezistentnost na herbicide. Sve ovo ukazuje da je fenomen

pojave i širenja rezistentnosti korova na herbicide veoma kompleksan, što znači da su veoma važne strategije u praćenju, proučavanju i borbi protiv ove pojave u agroekosistemu.

## ALS INHIBITORI - OSNOVNE KARAKTERISTIKE I BRZINA RAZVOJA REZIDENTNOSTI

Najmanje pet različitih hemijskih grupa herbicida inhibiraju acetolaktat sintezu (ALS), tj. acetohidroksi-kiselu sintetazu (AHAS), to su: sulfoniluree, imidazolinoni, triazolopirimidini, sulfonilaminokarboniltriazolinoni i piridiniloksibenzoati (Powles i Shaner, 2001). Iako su navedene grupe strukturno veoma različite, one imaju isti mehanizam delovanja, inhibiraju enzim acetolaktat sintetazu. Od ALS inhibitora prvi je u upotrebu 1982. godine uveden hlorsulfuron (Saari i sar., 1990; Foes i sar., 1999). Međutim, nakon pet godina intenzivne primene ALS inhibitora uočeni su prvi slučajevi rezistentnosti korovskih biljaka na ove herbicide. Heap (1999) navodi da je problem rezistentnosti korova na ALS inhibitore prisutan na površinama koje se koriste za proizvodnju strnih žita, kukuruza, soje i pirinča, i da je najveći broj potvrđenih slučajeva u SAD, Kanadi i Australiji (Itoh i sar., 1999). S druge strane, ova grupa herbicida je zahvaljujući svojim specifičnostima (niske količine primene, niska toksičnost za sisare i širok spektar korovskih vrsta koje suzbijaju) našla široku primenu u poljoprivredi (Wright i Penner, 1998). Aktivnost ovih herbicida se zasniva na inhibiciju ALS, esencijalnog enzimu u biosintezi aminokiselina razgranatog lanca (valin, leucin i izoleucin) u biljkama. Pri tome, kod osetljivih biljaka prouzrokuju oštećenja u vidu nekroze apikalnih meri-

stema, koja dalje zaustavlja rast biljaka u slučaju njihove primene preko zemljišta, dok pri folijarnoj primeni dovode do pojave ljubičaste boje duž središnjeg listnog nerva (Abranthy, 1992; Lovell i sar., 1996).

Prema najvećem broju istraživača, rezistentnost prema ALS inhibitorima se razvija vrlo brzo, posle nekoliko uzastopnih tretiranja istim ili herbicidima istog mehanizma delovanja (Adkins i sar., 1997; Uchino i sar., 1999; Wolf i sar., 2000). Tako, na primer, Saari i saradnici (1994) i Sprague i saradnici (1997a) navode da su istraživanja pojave rezistentnosti korova na ovu grupu herbicida pokazala da se rezistentnost obično razvija posle 4-7 uzastopnih tretiranja ALS inhibitorima. Horak i Peterson (1995), zatim Sprague i saradnici (1997a) su utvrdili da je vrsta *Amaranthus rudis* Sauer razvila rezistentnost na imazetapir odmah posle druge uzastopne primene ovog herbicida. Isti autori navode da uzroci rezistentnosti mogu biti posledica visoke zastupljenosti rezistentnih individua u prirodnoj populaciji, ili ako seme korova potiče sa drugog mesta od rezistentne populacije. Takođe, 1992. godine je utvrđeno da je štir (*Amaranthus retroflexus* L.) razvio rezistentnost na sulfo-meturon-metil posle treće godine uzastopne primene u kombinaciji sa simazinom (Sibony i sar., 1992; Sibony i sar., 2001). Generalno, smatra se da su vrste roda *Amaranthus* ekstremno osetljive na mnoge ALS inhibitore, zbog toga što poseduju mnoge karakteristike (pre svega sklonost ka mutacijama) koje se često mogu dovesti u vezu sa pojavom rezistentnosti kod populacija ovog roda. Ovo je potvrđeno na nivou velikog broja vrsta štira i to: *Amaranthus palmeri* S. Wats. (Horak i Peterson, 1995; Gaedert i sar., 1997; Sprague i sar., 1997b), *A. retroflexus* L. (Sibony i sar., 1992; Sibony i

sar., 2001; Gerwick i sar., 1993; Saari i sar., 1994), *A. blitoides* S. Wats. (Saari i sar., 1994), *A. rudis* (Horak i Peterson, 1995; Lovell i sar., 1996; Hinz i Owen, 1997; Sprague i sar., 1997a, 1997b; Wagner i sar., 2002a i b), *A. lividus* L. (Manley i sar., 1996) i *A. hybridus* (Manley i sar., 1996, 1999a; Poston i sar., 2000).

Rubin (1996), potom Sibony i saradnici (2001) ističu da neke korovske vrste razvijaju rezistentnost na ALS inhibitore usled uzastopne primene tri ili više godina herbicida iz grupe sulfonilurea ili imidazolinona. Itoh i saradnici (1999) su potvrdili rezistentnost populacija *Lindernia micrantha* D. u usevu pirinča, koje su 80 do 300 puta bile manje osetljive na herbicide iz grupe sulfonilurea posle tri do sedam godina uzastopne primene bensulfuron-metila, pirazosulfuron-etila, imzosulfurona i etosulfurona. Slični podaci su dobijeni i o rezistentnosti populacija mišjakinje (*Stellaria media* L. Vill.) na ALS inhibitore posle osam uzastopnih godina primene hlorsulfurona ili metsulfurona (Kudsk i sar., 1995). Ova, kao i slična istraživanja drugih autora (Boutsalis i Powles, 1995; Sprague i sar., 1997a; Anderson i sar., 1998a i b; Manley i sar., 1998; Poston i sar., 2000), koja se odnose na rezistentnost na ALS inhibitore, upućuju na konstataciju da pojava i brzina razvoja rezistentnosti korova na herbicide zavisi od dužine selekcionog pritiska, s jedne strane, kao i biljne vrste, s druge strane.

#### MEHANIZAM I GENETIČKE OSNOVE REZISTENTNOSTI KOROVSKIH BILJAKA NA ALS INHIBITORE

Svaka biohemijska promena koja omogućava biljci da preživi herbicidni tretman može biti uzrok rezistentnosti.

To znači da rezistentnost može nastupiti usled promene primarnog mesta delovanja (ciljanog mesta) herbicida, što dovodi do manjeg vezivanja herbicida, ili zbog preosetljivosti primarnog mesta delovanja. Takođe, rezistentnost se ispoljava i prilikom detoksikacije, zatim "zarobljavanja" herbicida, ili smanjenog usvajanja tako da manja količina herbicida dospe do ciljanog enzima. Na kraju, biljka može preživeti delovanje herbicida ukoliko raspolaže takvim metabolizmom koji će joj omogućiti da se zaštiti od produkovanih toksičnih komponenti nastalih u procesu aktivacije herbicida (Powles i Schaner, 2001).

U cilju lakšeg sagledavanja najvažnijih biohemijskih i genetičkih osnova rezistentnosti korova na herbicide mehanizme rezistentnosti je moguće grupisati na sledeći način:

- mehanizam rezistentnosti lociran na primarnom mestu delovanja herbicida;
- mehanizam rezistentnosti lociran izvan primarnog mesta delovanja herbicida, ili metabolizam herbicida;
- ukrštena rezistentnost locirana na primarnom mestu delovanja herbicida;
- ukrštena rezistentnost locirana izvan primarnog mesta delovanja herbicida; i
- multipla (višestruka) rezistentnost.

Acetolaktat sintetaza je prvi zajednički enzim u biosintezi aminokiselina razgranatog lanca (valin, leucin i izoleucin) koji katalizuje dve paralelne reakcije; kondezaciju dva molekula piruvata u acetolaktat i jednog molekula piruvata sa jednim molekulom 2-oksibutirata u acetohidroksibutirat. Acetolaktat je prekursor u sintezi valina i leucina, dok je acetohidroksibutirat prekursor u sintezi izoleucina (Eberlein i sar., 1999). Herbicidi iz grupe ALS inhibitora onemogućavaju da enzim ALS katalizuje navedene reak-

cije sprečavajući sintezu ove tri aminokiseline u osetljivim biljkama, a to dalje inhibira deobu ćelija meristemskih tkiva i na taj način se zaustavlja rast biljaka. Međutim, u slučaju pojave rezistentnosti ovi herbicidi ne mogu da utiču na aktivnost enzima, što rezistentnim populacijama omogućava da prežive primenu herbicida ALS inhibitora.

Utvrđeno je da su mnoge gajene i korovske vrste tolerantne na ALS inhibitore (Saari i sar., 1994; Anderson i sar., 1998a). Prirodna tolerantnost (otpornost) se objašnjava brзом detoksikacijom navedenih herbicida, tako što ih tolerantne vrste metabolišu u nefitotoksične komponente putem reakcija hidroksilacije uz učešće citohrom-450 monooksigenaza (Browin, 1990; Fonne-Pfister i sar., 1990; Frear i sar., 1991; Anderson i sar., 1998a). Iako se prirodna tolerantnost biljaka na ALS inhibitore pripisuje metabolizmu, evidentno je da uzrok rezistentnosti korova na ove herbicide leži u neosetljivosti ALS enzima na njih (Sattin i sar., 1999).

Za uspešno prevazilaženje problema vezanog za rezistentnost korovskih biljaka na herbicide ALS inhibitore i njenog nasleđivanja, značajno je poznavanje genetičkih osnova rezistentnosti biljaka. Geni koji određuju rezistentnost korova na neki herbicid prisutni su u prirodnoj populaciji i u odsustvu tih herbicida. Tretiranjem takvih populacija odgovarajućim herbicidima osetljive individue uginjavaju, dok rezistentne (otporne) preživljavaju. To znači, da inicijalna frekvencija rezistentnih alela ima presudni uticaj na razvoj rezistentnih populacija (Jasieniuk i sar., 1996). Jasieniuk i saradnici (1996) su, takođe, zapazili da rezistentni aleli povećavaju frekvenciju mnogo brže nego recesivni. Mallory-Smith i saradnici (1990b) navode da je

rezistentnost na herbicide ALS inhibitora, u svim ispitivanim slučajevima, kontrolisana preko jednog, kodiranog gena koji je ili dominantan, ili ima nekompletnu dominantnost (semidominantan).

Shaner (1991), zatim Lovell i saradnici (1996) tvrde da do pojave rezistentnosti mogu da dovedu mutacije na bar pet različitih mesta (delokruga) na ALS enzimu. Unutar svakog od pet delokruga, mutacije koje uključuju supstituciju pojedinačnog nukleotida, kad se odigraju, uzrokuju promenu u aminokiselini i time rezistentnost na ALS inhibitore (Boutsalis i sar., 1999). Konstatovano je da mutacije na kodonu prolina u delokrugu "A" ALS gena imaju osnovnu ulogu u razvoju rezistentnosti na ALS inhibitore (Guttieri i sar., 1992; Guttieri i sar., 1995; Haughn i sar., 1988; Wiersma i sar., 1989; Eberlein i sar., 1997). U vezi s tim, Eberlein i saradnici (1999) navode da su mutacije na primarnom mestu delovanja herbicida u delokrugu "A" ALS gena, koje prouzrokuju supstituciju prolina histidinom uzrok rezistentnosti kod vrste *Lactuca sativa* L. na ALS inhibitore, a ista izmena je konstatovana i kod rezistentnih populacija divlje salate (*Lactuca serriola* L.). Više autora (Boutsalis i sar., 1999; Sibony i sar., 2001) je potvrdilo mutacije locirane na prva dva nukleotida u kodonu prolina, koje su dovele do supstitucije prolina izoleucinom, kod rezistentnih populacija vrste *Sisymbrium orientale* L. Haughn i saradnici (1986), kao i Dyer i saradnici (1993), pak, rezistentnost *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh na ALS inhibitore objašnjavaju supstitucijom prolina serinom.

Drugi model rezistentnosti korova na ALS inhibitore je opisan kod populacija *Lolium rigidum* Gaud. i *Alopecurus myosuroides* Huds. na hlortoluron i izopro-

turon. Smatra se da je do pojave rezistentnosti kod ovih korovskih vrsta došlo usled određenih metaboličkih promena koje su omogućile takvim populacijama da brzo metabolišu ALS herbicide u nefitotoksične komponente (Kemp i sar., 1990; Mettheas i sar., 1990; Anderson i sar., 1998a).

Ukrštena rezistentnost, odnosno rezistentnost na više herbicida sa istim mehanizmom delovanja, takođe se veoma često javlja u praksi. Za razliku od rezistentnosti na triazinske herbicide, rezistentnost na herbicide ALS inhibitore bazirana na primarnom mestu delovanja, može biti pripisana velikom broju različitih mesta gde se dešavaju mutacije. Naime, različite hemijske grupe herbicida koje inhibiraju ALS enzim imaju različita primarna mesta delovanja. Razlike su u supstituciji aminokiselina koje se dešavaju unutar regiona vezivanja. Saari i saradnici (1994) su ukazali da je primarno mesto delovanja kod ukrštene rezistentnosti između sulfonilurea i triazolopirimidina zajedničko, i u vezi je sa mutacijom na prolinu 197. U stvari, šest različitih aminokiselina, alanin, arginin, glutamin, leucin, serin ili treonin mogu da zauzmu mesto prolinu 197 što dovodi do ispoljavanja rezistentnosti. Međutim, primarno mesto ukrštene rezistentnosti između sulfonilurea i imidazolinona je teže predvideti. Prvi slučaj ukrštene rezistentnosti na ALS inhibitore utvrđen je kod vrste *Datura innoxia* Mill., koja je razvila rezistentnost na imidazolinone i sulfoniluree (Saxena i King, 1988; Lovell i sar., 1996). Ukrštena rezistentnost, u okviru ALS inhibitora, detektovana je i kod klasače (*Bromus tectorum* L.), posle dva uzastopna tretiranja sa nikosulfuronom u polju i treće godine tretiranja sa sulfosurfuronom u kontrolisanom prostoru (Mallory-Smith i sar., 1999). Tako-

đe, potvrđeno je nekoliko slučajeva ukrštene rezistentnosti na sulfonilurea i imidazolinone kod vrste *Kochia scoparia* L. (Sivakumaran i sar., 1993).

Multipla (višestruka) rezistentnost je oblik rezistentnosti kada je prisutno više od jednog mehanizma rezistentnosti kod jedne populacije korova. Takve populacije korova mogu biti naročito problematične za suzbijanje, posebno ukoliko ne postoji veliki broj mogućih herbicida za suzbijanje date korovske vrste. Multipla rezistentnost se može javljati u okviru različitih kombinacija kao što su: mehanizam baziran na primarnom mestu delovanja (a), mehanizmi bazirani na primarnom mestu delovanja i metabolizmu (b), i kombinacije ostalih mehanizama (smanjena aktivacija herbicida, povećano vezivanje itd.) (c) (Powles i Shaner, 2001). Ovakav oblik rezistentnosti detektovan je na primer kod vrste *Kochia scoparia* L. na triazinske i sulfonilurea herbicide (Foes i sar., 1999). Posle višegodišnje primene triazina usled pojave rezistentnosti izbor je prešao na herbicide ALS inhibitore, na koje je, takođe, posle nekoliko uzastopnih godina primene ova vrsta razvila rezistentnost. Rezultat toga je pojava multiple rezistentnosti kod populacija *K. scoparia*, sa dva odvojena mehanizma rezistentnosti. Rezistentna populacija nosi D1 neosetljivi protein na triazinske herbicide usled supstitucije glicina sa serinom na poziciji 264. Uz to, izmena leucina sa triptofanom na poziciji 570 kod ALS enzima dovela je do modifikacije ALS enzima koji je time postao neosetljiv na herbicide iz grupe sulfonilurea i imidazolinona. Sličan oblik multiple rezistentnosti utvrđen je i kod vrste *Amaranthus rudis* (na triazinske i herbicide ALS inhibitore) Foes i sar., 1998). Kotoula-Syka i saradnici (2002) su, takođe, potvrdili slučaj multiple rezis-



tentnosti kod populacija vrste *Lolium rigidum* na diklofop-metil (inhibitor ACC-aze odgovorne za biosintezu lipida) i hlorsulfuron (inhibitor ALS enzima odgovornog za biosintezu aminokiselina).

Foes i saradnici (1999) upozoravaju da bi pojava multiple rezistentnosti (rezistentnost na herbicide različitih hemijskih grupa sa različitim mehanizmima delovanja) koji je uočilo više istraživača (Foes i sar., 1998; Hall i Stromme, 1998; Powles i Shaner, 2001; Kotoula-Syka i sar., 2002) mogla da postane novi trend u razvoju rezistentnosti korova na herbicide. Razvoj multiple, kao i ukrštene rezistentnosti, je brži u uslovima monokulture i minimalne obrade zemljišta (Gassner, 1990; Rubin, 1991; Lior i sar., 2000).

#### METODE ZA DETEKCIJU REZISTENTNOSTI NA ALS INHIBITORE

Uprkos tome što se zna koji faktori doprinose razvoju rezistentnosti, mogućnosti prognoze njenog razvoja još uvek su skromne. Iskustva govore da se ovom problemu ne pridaje naročita pažnja sve dok se pojava visoko ne manifestuje. Da bi se pojava i razvoj rezistentnosti mogli pratiti, i kao nastali problem rešiti, neophodne su pouzdane metode, a poželjno je da te metode budu i brze, lako izvodljive i jeftine.

Za detekciju rezistentnosti korovskih biljaka na ALS inhibitore, danas se preporučuju sledeće metode: zapažanja u polju, postavljanje eksperimenata u polju, istraživanja na nivou cele biljke (praćenje različitih morfometrijskih parametara), klijavost polena, merenje količine acetoina i tehnike analize DNA.

#### Zapažanja u polju

Zapažanja u polju mogu da se koriste za praćenje rezistentnosti na bilo koju grupu herbicida. Ova metoda više govori o efikasnosti primenjenog herbicida nego o rezistentnosti. Zapažanja u polju ukazuju da je rezistentnost možda prisutna, što je neophodno proveriti nekom pouzdanijom metodom. Neefikasnost herbicida često se pripisuje faktorima kao što su: nepovoljni uslovi sredine, izvedena primena herbicida u neodgovarajućoj fazi razvoja korovske biljke i neadekvatna primena herbicida. Kada se ti faktori eliminišu, neefikasnost primenjenog herbicida može se pripisati rezistentnosti.

Iako nije moguće potvrditi prisustvo rezistentnosti samo na osnovu zapažanja i razmatranja podataka iz polja, Moss (1995) navodi nekoliko činilaca koji mogu da ukažu u kom pravcu bi trebalo da se razmišlja:

- ostvaren nivo suzbijanja drugih osetljivih vrsta;
- prisustvo živih biljaka u blizini uginulih;
- iskustva iz prošlosti (isti preparat je godinama uspešno suzbijao vrste koje su sada preživele);
- istorija primene herbicida;
- pojava rezistentnosti na susednim parcelama;
- tehnologija gajenja useva i obrada zemljišta.

Zapažanja u polju su korisna, ali ne i dovoljna za potvrđivanje ili odbacivanje sumnje o postojanju rezistentnosti.

#### Postavljanje eksperimenata u polju

Ako primenjeni herbicidi ispolje slabu efikasnost, potrebno je iste godine postaviti poljski ogled na populaciji za

koju se sumnja da je rezistentna na dati herbicid. Međutim, postoje i neka ograničenja, kao što je zakašnjenje u postavljanju ogleada, tako da herbicid možda ne bi bio primenjen u adekvatnoj fazi razvoja korovske biljke. Druga mogućnost je da se oglead postavi naredne godine, na istom mestu, što bi omogućilo veću efikasnost u izboru i vremenu primene herbicida. Zaključci mogu da se donose na osnovu vizuelne ocene smrtnosti ili bujnosti, ili merenjem sveže i suve podzemne i nadzemne mase. Na ovaj način mogu se izbeći problemi kao što je npr. dormantnost semena.

### Istraživanja na nivou cele biljke

Metoda koja se najčešće koristi za ispitivanje rezistentnosti korova na herbicide jeste istraživanje na celim biljkama. Biljke se gaje u zaštićenom prostoru (staklare i fitotroni) i na njima se prate različiti morfološki parametri nakon tretiranja herbicidima. Biljke mogu da se dobiju iz semena ili da se presade iz polja, i gaje se u saksijama sa zemljom ili na nekoj hranljivoj podlozi (npr. vodene kulture). Biljke koje se nalaze u odgovarajućoj fazi razvoja tretiraju se različitim količinama herbicida. Posle odgovarajućeg vremenskog perioda (najčešće 7-10 dana) vizuelno se ocenjuju smrtnost i bujnost, meri sveža i suva masa, površina listova i drugi morfometrijski parametri. Iako ispitivanja u saksijama imaju svoja ograničenja, pomoću ove metode mogu da se imitiraju uslovi iz polja i, bez obzira na mehanizam, da se otkrije rezistentnost. Glavna ograničenja ove metode leže u neophodnosti sakupljanja semena, koja mogu da poseduju urođenu dormantnost, zatim vremenu koje treba da prođe da bi se dobili rezultati, neophod-

noj radnoj snazi i fitotronima (Moss, 1995).

Manley i saradnici (1998) u ispitivanju koje je potvrdilo visok nivo rezistentnosti *Amaranthus hybridus* L. na imazakvin i imazapir, i nizak nivo ukrštene rezistentnosti na rimsulfuron i hlorimuron koristili su ovu metodu. Naime, od sakupljenog semena biljke su gajene u staklari i posle tretmana navedenim herbicidima urađena je ocena delovanja merenjem suve mase.

Kudsk i saradnici (1995) su za proveru rezistentnosti mišjakinje (*Stellaria media* (L.) Vill.) na sulfoniluree izveli oglead u kontrolisanim uslovima. Semena mišjakinje, koja su sakupljena sa biljaka koje su preživele tretmane sulfonilureama, posejana su u saksije. Dobijene biljke su tretirane različitim količinama herbicida i uzorkovane su 3-6 nedelja posle tretmana. Zaključci su doneti na osnovu određivanja suve mase.

Boutsalis i Powles (1995) su ispitivali rezistentnost *Sonchus oleraceus* (L.) Go-uau i *Sisymbrium orientale* L. na ALS inhibitore ovom metodom. Biljke su gajili u saksijama (u staklari) do primene herbicida, a zatim su ih izneli u polje. Rezistentnost su ocenjivali na osnovu suve mase preživelih biljaka.

Tri populacije divlje rotkve (*Raphanus raphanistrum* L.) za koje se očekivalo da su rezistentne na hlorsulfuron testirane su 1998. godine, korišćenjem test brze procedure ("Quick - Test Procedure") (Boutsalis, 2001; Walsh i sar., 2001). U ovom ogledu biljke su prenete iz polja u laboratoriju i presadene u plastične saksije. Tretirane su dva puta hlorsulfuronom. Preživele biljke su gajene do zrenja u staklari, u ograđenom izolovanom prostoru, koji je trebalo da spreči ukršteno oprašivanje. U periodu cvetanja obavlj-

no je ručno oprašivanje između biljaka iste populacije, i u vreme zrenja sakupljena su semena. Sledeće vegetacione sezone dobijena semena iz prethodne generacije su posejana u staklari i dobijene biljke su tretirane na isti način kao u prethodnoj vegetaciji. Ocena rezistentnosti urađena je 35 dana nakon tretmana utvrđivanjem smrtnosti, koji je izražen u procentima.

Ovaj metodski postupak, kako navode Holt i Le Baron (1990), potom Moss i Rubin (1993) najčešće je korišćen za ispitivanje rezistentnosti korova na herbicide svih hemijskih grupa, pri čemu je najčešće rađena ocena rasta i prinos biomase (Smit i Cairns, 2001).

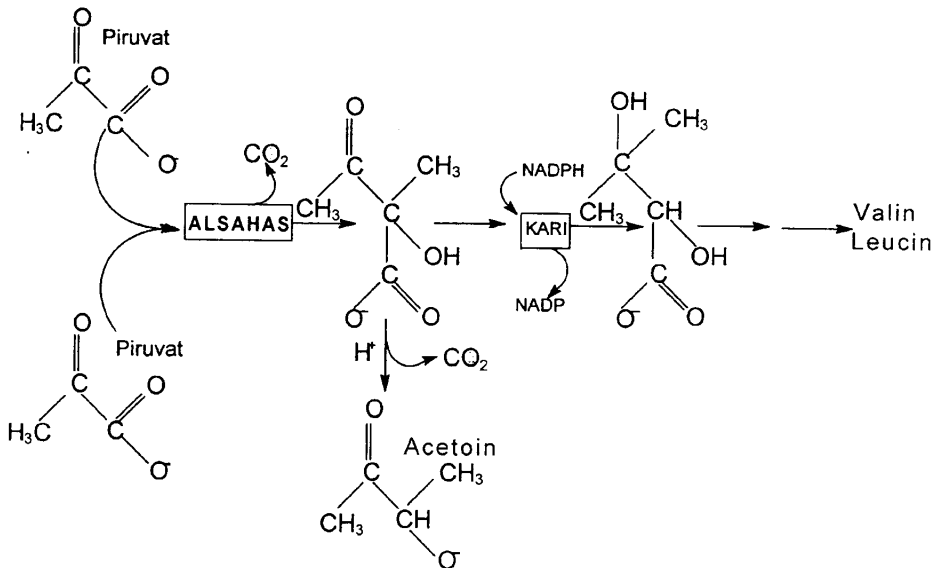
### Ispitivanje klijavosti polena

Ova, relativno nove metoda (Letouze, 1997) se bazira na poređenju klijavosti polena rezistentnih i osetljivih biotipova

korova u prisustvu herbicida. Polen rezistentnih biotipova normalno klija za razliku od polena osetljivih biotipova, čija je klijavost inhibirana u prisustvu herbicida. Richter i Powles (1993), kao i Moss (1995) su koristili ovu metodu kod ispitivanja rezistentnosti biotipova *Lolium rigidum* na inhibitore karboksilaze i ALS enzima. Faktor koji ograničava korišćenje ove metode jeste faza cvetanja korova; neki korovi cvetaju isuviše rano, dok drugi ne mogu da dostignu ovu fazu u kontrolisanim uslovima.

### Merenje količine acetoina

Određivanje količine acetoina je metoda koja se, sa raznim modifikacijama, veoma često koristi za detekciju rezistentnih biotipova korova na herbicide ALS inhibitore. Acetoin se stvara u procesu dekarboksilacije acetolaktata, koji nastaje kondenzacijom dva molekula pi-



Sl. 3. Kretanje ugljenika iz piruvata pri biosintezi valina i leucina (Gerwick i sar., 1993).  
Fig. 3. Carbon flux from pyruvate into valine and leucine biosynthesis.

ruvata u reakciji koju katalizuje enzim ALS (Sl. 3). Ova metoda se zasniva na merenju akumuliranog acetoina u prisustvu i odsustvu ALS inhibitora. Inhibicijom acetolaktat sintetaze / acetohidroksikisele sintetaze (ALS/AHAS) sprečava se stvaranje acetoina i na osnovu toga mogu se razlikovati osetljive i rezistentne populacije.

Postupak je takav da se uzorci svežeg biljnog materijala u kojima se meri sadržaj acetoina zamrznu u tečnom azotu, a potom se isitne sa nerastvorljivim polivinilpolipirrolidinom i homogenizuju. Nakon toga dodaju se dve zapremine pufera za ekstrakciju tako da minimalna zapremina za korišćenje ne bude manja od 4 ml. Homogenat se potom centrifugira na 27 000 x g u trajanju od 15 minuta. Supernatant se tretira sa amonijum sulfatom (31% i 62%) i nakon drugog tretmana dobijeni talog se rastvori u 300 µl pufera za ekstrakciju. Iz uzorka se uklanjaju soli sa dejonizujućom kolonom, a puferom za eluiranje se skida enzim sa zidova kolone. Svežem enzimu se dodaje rastvor herbicida i pufer, i dobijena smeša inkubira 60 minuta na 37 °C. Reakcija se zaustavlja dodavanjem sumporne kiseline. Nakon inkubacije dodaje se kreatin i naftol i ponovo se sve inkubira 15 minuta na 60 °C. Koncentracija acetoina se meri spektrofotometrijski na 530 (525) nm, metodom koju je opisao Westfeld (1945). Vrednosti dobijene na ovaj način mogu se preračunati u mg acetoina korišćenjem prethodno uspostavljenih standarda.

Jednu od varijanti opisane metode koristili su Gerwick i saradnici (1993) za određivanje količine acetoina u listovima lipice teofrastove (*Abutilon theophrasti* Medic.). Oni su akumulaciju acetoina in-

dukovali inhibicijom kisele ketol reduktiozomeraze, enzima koji neposredno prati ALS/AHAS u biosintezi aminokiselina razgranatog lanca. Uzorak biljnog materijala su zakiselili sumpornom kiselinom i zagrevali da bi se ubrzala dekarboksilacija acetolaktata u acetoin. Dodavanjem natrijum-hidroksida i kreatina na temperaturi od 37 °C došlo je do promene boje. Potom je urađeno centrifugiranje a onda izmerena apsorpcija na 530 nm.

Na sličan način Lovell i saradnici (1996) su ispitivali rezistentnost *Amaranthus rudis* Sauer na imidazolinone i sulfoniluree. Uzorke lišća su držali na -20 °C tokom 24 sata, nakon toga ceo sadržaj je promućkan, dodat natrijum-hidroksid i na kraju izmerena apsorpcija na 530 nm, metodom koju je opisao Westfeld (1945). Dobijene vrednosti su preračunate u mg acetoina korišćenjem prethodno uspostavljenih standarda koje su dali Simpson i saradnici (1995). Opisanoj metodi koristili su i Eberlein i saradnici (1997) da bi utvrdili rezistentnost *Lactuca serriola* L. na ALS inhibitore.

Prednost ove metode (određivanje sadržaja acetoina) sastoji se u kratkom vremenskom periodu koji je potreban za dijagnozu, primenljivost za veći broj korovskih vrsta, niska cena reagenasa, kao i njena pouzdanost (Gerwick i sar., 1993).

### Tehnika određivanja DNA

Najčešći uzrok rezistentnosti korova na herbicide ALS inhibitore su mutacije na ALS genu koje kodiraju supstituciju aminokiselina na ALS enzimu. Zahvaljujući tome za detekciju rezistentnih biotipova, kao i upoznavanje mehanizama razvoja rezistentnosti na navedenu grupu herbicida, mogu se koristiti metode bazirane na analizi DNA, tj. ALS genoma.

Metode molekularnih markera su trenutno veoma aktuelne za brzo utvrđivanje mesta mutacija kod rezistentnih korovskih populacija na herbicide ALS inhibitore. Lančane reakcije polimeraza (PCR - "Polymerase Chain Reaction") je najčešće korišćen metod za brzo i besprekorno umnožavanje fragmenata specifičnih DNA. To znači, da se PCR tehnika može koristiti za utvrđivanje specifičnih mutacija, odnosno, detekciju rezistentnih biotipova na ALS inhibitore. Osnovni postupak za izvođenje ovih metoda je sledeći (Wolf i Liston, 2000):

- dvostruki lanci DNA (koja se prethodno ekstrahuje iz listova) denaturišu se na visokoj temperaturi do jednostrukih lanaca;

- kratki oligonukleotidni prajmeri, na nižoj temperaturi, se vezuju tokom postepenog hlađenja za jednostruke komplementarne lance uzoraka za krajeve bočno od ciljane sekvence;

- povećanjem temperature se postiže proširivanje ciljanih sekvenci prajmerima;

- novosintetisani dvostruki lanci ciljanih sekvenci DNA se denaturišu na visokoj temperaturi i ciklus se ponavlja.

Nekoliko različitih metoda za ove namene, baziranih na PCR tehnici, testirane su i opisane u literaturi. Jedna od tih metoda je PASA (PCR Amplification of Specific Allels), zatim ARMS (Amplification Refractory Mutation System), kao i AS-PCR (Allele-Specific Polymerase Chain Reaction).

PASA, sa posebno pripremljenim prajmerima i prilagođavanje uslova PCR, omogućava brzo detektovanje promena pojedinačnih nukleotida u kodiranoj DNA za enzim ALS. Jednostavan i tačan odgovor, dobijen preko PASA, ukazuje da je to efikasan i lak način za

praćenje rezistentnosti na herbicide, bazirano na pojedinačnim mutiranim mestima u biljkama.

Wagner i saradnici (2002a i b) su koristili PCR za umnožavanje specifičnih alela (PASA - umnožavanje specifičnih alela lančanim reakcijama polimeraza) za brzu detekciju mutacija na jednom mestu, kod rezistentnih populacija *A. rudis* Sauer i *A. retroflexus* L. na herbicide ALS inhibitore. Dva para prajmera je sintetisano za umnožavanje specifičnih alela ALS gena iz rezistentnih i osetljivih biotipova. Prajmeri specifičnih alela se lako uparuju sa adekvatnim alelom, a loše sa drugim (neadekvatnim) alelima na trećem mestu od kraja. Za razdvajanje umnoženih DNA fragmenata koristi se metoda elektroforeze. Dobra strana ove metode je mogućnost detekcije promena pojedinačnih nukleotida bez potrebe za sekvencioniranjem celog gena ili fragmenta gena. Takode, prednost je i u tome što rezistentne i osetljive biljke mogu da se razlikuju i u ranim fazama razvića. Znači, u poređenju sa drugim tehnikama za utvrđivanje rezistentnosti ova metoda omogućava veoma precizno (na molekularnom nivou) i brzo detektovanje rezistentnosti.

Wetzel i saradnici (1999) su koristili AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) tehniku za ispitivanje prenošenja osobina rezistentnosti sa *Amaranthus palmeri* S. Wats. na *Amaranthus rudis* Sauer. Ova tehnika se zasniva na selektivnoj PCR amplifikaciji određenih fragmenata DNA.

Postoji realna mogućnost da se ova tehnika u budućnosti koristi za rutinska testiranja rezistentnosti, a za sada ima veći značaj samo na naučnoistraživačkom polju.

## STRATEGIJE ZA SPREČAVANJE POJAVE REZISTENTNOSTI KOROVA NA HERBICIDE

Pojava rezistentnosti predstavlja ozbiljan problem u uslovima intenzivne poljoprivredne proizvodnje, naročito u razvijenim zemljama Evrope i Amerike. Stoga je sprečavanje ove pojave i upravljanje njome, kada je prisutna, veoma važno. Strategije za sprečavanje pojave rezistentnosti korova na herbicide treba da budu usmerene na sledeće:

- praćenje i predviđanje ove pojave u donošenju odluka o načinu suzbijanja korova;
- izbegavanje gajenja useva u monokulturi;
- princip kontrole korova na obradivim površinama mora biti koncipiran na integralnoj zaštiti;
- obavezna rotacija herbicida (korišćenje herbicida iz različitih hemijskih grupa);
- primena dvojnih ili trojnih herbicidnih kombinacija sa različitim mehanizmom delovanja;
- pravilan postupak kod primene herbicida (doze, rokovi primene i karence).
- vođenje računa o sinergističkim efektima kod primene različitih pesticida (npr. herbicid - insekticid);
- primena najefikasnijih herbicida za datu varijantu.

Prema najnovijem konceptu, strategija suzbijanja korova uključuje i gajenje GMO (genetski modifikovani organizmi) useva, koji nose gen otpornosti na neselektivne herbicide, kao što je npr. glifosat. Prema mišljenju pristalica ovog koncepta, ovim bi se smanjile količine primene herbicida a time i troškovi suzbijanja korova, odnosno imali bismo čiste proizvodne površine. Međutim, mišljenja su podeljena s obzirom na određene

manjkavosti GMO koncepta koji, u krajnjem, ne rešava problem rezistentnosti.

## ZAKLJUČNE KONSTATACIJE

Rezistentnost korova na različite hemijske grupe herbicida, pa tako i ALS inhibitore, ima ne samo naučni, već i praktični značaj. O ovom problemu se obično ne vodi računa sve dok se on ne javi u polju. Globalno, u ovom trenutku veći značaj ima razvoj rezistentnosti na inhibitore ALS i ACC-aze, nego na druge grupe herbicida.

Pitanja vezana za rezistentnost koja još nisu detaljno razjašnjena su: uzroci nastanka, mehanizam razvoja, metode detekcije, strategija za izbegavanje i usporavanje razvoja rezistentnosti.

Rezistentnost korova na ALS inhibitore razvija se vrlo brzo, posle nekoliko godina uzastopne primene (3-8 godina), pri čemu je smanjena osetljivost ALS najčešći mehanizam rezistentnosti na ovu grupu herbicida.

Za dijagnozu rezistentnosti korova na ALS inhibitore mogu da se koriste različite metode; posmatranja u polju, postavljanje ogleđa u polju, ispitivanja na celim biljkama, ispitivanja klijavosti polena, merenje količine acetoina i tehnike analize DNA.

Dobra metoda za detekciju rezistentnosti treba da bude pouzdana, brza, precizna i jeftina. Da bi se borba sa rezistentnošću uspešno vodila, u nju moraju da se uključe svi relevantni subjekti; poljoprivredni proizvođači, proizvođači herbicida, stručnjaci u primarnoj proizvodnji i naučni kadar.

## LITERATURA

- Abel, A. L. The rotation of weed killers. Proceeding Brighton Weed Control Conference, 2, 249-259, 1954.

- Adkins, S. W., Wills, D., Boersuma, M., Walker, S. R., Robinson, G., Mcleod, R. J. and Einam, J. P.: Weeds resistant to chorsulfuron and atrazine from the north - east grain region of Australia. *Weed Res.*, **37**, 343-349, 1997.
- Allen, J. R., Johnson, W. G., Smeda, R. J., Wiebold, W. J. and Massey, R. E.: Management of Acetolactate Synthase (ALS) - Resistant Common Sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Soybean (*Glycine max*). *Weed Techn.*, **15**, 571-575, 2001.
- Anderson, D. D., Nissen, S. J., Martin, A. R. and Roeth, F. W.: Mechanism of primisulfuron resistance in shattercane (*Sorghum bicolor*) biotype. *Weed Sci.*, **46**, 158-162, 1998a.
- Anderson, D. D., Roeth, F. W. and Martin, A. R.: Discovery of a Primisulfuron-Resistant Shattercane (*Sorghum bicolor*) Biotype. *Weed Techn.*, **12**, 74-77, 1998b.
- Boutsalis, P. and Powles, S. B.: Resistance of dicot weeds to acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicides in Australia. *Weed Res.*, **35**, 149-155, 1995.
- Cirujeda, A., Recasens, J. and Taberner, A.: A qualitative quick - test for detection of herbicide resistance to tribenuron - methyl in *Papaver rhoeas*. *Weed Res.*, **41**, 523-534, 2001.
- Dyer, W. E., Chee, P. W. and Fay, P. K.: Rapid Germination of Sulfonylurea-Resistant *Kochia scoparia* L. Accessions is Associated with Elevated Seed Levels of Branched Chain Amino Acides. *Weed Sci.*, **41**, 18-22, 1993.
- Eberlein, C. V., Guttieri, M. J., Mallory - Smith, C. A., Thill, D. C. and Baerg, R. J.: Altered acetolactate synthase activity in ALS-inhibitor resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Sci.*, **45**, 212-217, 1997.
- Eberlein, Ch., Guttieri, M., Berger, Ph., Fellman, J., Mallory-Smith, C. A., Thill, D., Baerg, R. and Belknap, W.: Physiological consequences of mutation for ALS-inhibitor resistance. *Weed Sci.*, **47**, 383-392, 1999.
- Feng, P. C. C., Prateley, J. E. and Bohn, J. A.: Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*: II. Uptake, traslocation, and metabolism. *Weed Sci.*, **47**, 412-415, 1999.
- Foes, M. J., Lui, L., Tranel, P. J., Wax, L. M. and Stoller, E. W.: A biotype of common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistant to triazine and ALS herbicides. *Weed Sci.*, **46**, 514-520, 1998.
- Foes, M. J., Vigue, G., Stoller, E. W. and Tranel, P. J.: A kochia (*Kochia scoparia*) biotype resistant to triazine and ALS inhibiting herbicides. *Weed Sci.*, **47**, 20-27, 1999.
- Gaeddert, J. W., Peterson, D. E. and Horak, M. J.: Control and Cross - Resistance of an Acetolactate Synthase Inhibitor-Resistant Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) Biotype. *Weed Techn.*, **11**, 132-137, 1997.
- Gerwick, B. C., Mireles, L. C. and Eilers, R. J.: Rapid Diagnosis of ALS/AHAS-Resistant Weeds. *Weed Techn.*, **7**, 519-524, 1993.
- Gill, G. S., Cousens, R. D. and Allan, M. R.: Germination, Growth, and Development of Herbicide Resistant and Susceptible Populations of Rigid Ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.*, **44**, 252-256, 1996.
- Hall, L. M., Stromme, K. M. and Horsman, G. P.: Resistance to acetolactate synthase inhibitors and quinclorac in a biotype of false cleavers (*Galium spurium*). *Weed Sci.*, **46**, 390-396, 1998.
- Hashem, A., Bowran, D., Piper, T. and Dhammu, H.: Resistance of Wild Radish (*Raphanus raphanistrum*) to Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicides in the Western Australia Weat Belt. *Weed Techn.*, **15**, 68-74, 2001.
- Heap, I. M.: International survey of herbicide-resistant weeds: Lessons and limitations. The 1999 Brighton Conference - Weeds, Brighton, U.K., 1999, pp. 769-776.
- Hinz, J. R. and Owen, M. D. K.: Acetolactate Synthase Resistance in a Common Waterhemp (*Amaranthus rudis*) Population. *Weed Techn.*, **11**, 13-18, 1997.
- Hollaway, K. L., Hallam, N. D. and Flynn, A. G.: Synergistic joint action of MCPA ester and metsulfuron-methyl. *Weed Res.*, **36**, 369-374, 1996.
- Itoh, K., Wang, G. X. and Ohbas, S.: Sulfonylurea resistance in *Lindernia micrantha*, an annual paddy weed in Japan. *Weed Res.*, **39**, 413-423, 1999.
- Jasieniuk M., Brule-Babel, A. L. and Morrison, I. N.: The Evolution and Genetics of Herbicide Resistance in Weeds. *Weed Sci.*, **44**, 176-193, 1996.
- Konstantinović, B., Elezović, I. i Marković, M.: Rezištentnost korovskih vrsta na herbicide i metode utvrđivanja. VI kongres o korovima, Banja Koviljača, 2000, str. 346-356.

- Kotoula-Syka, E., Tal, A., Georgoula, I. and Rubin, B.: Biochemical mechanisms of multiple resistance to diclofop- methyl and chlorsulfuron in *Lolium rigidum* from Northern Greece. 12<sup>th</sup> EWRS Symposium, Wageningen, the Netherlands, 2002, pp. 132-133.
- Kudsk, P., Maathiassen, S. K. and Cotterman, J. C.: Sulfonylurea resistance in *Stellaria media* (L.) Vill. Weed Res., **35**, 19-24, 1995.
- Lee, C. D., Matrin, A. R., Roeth, F. W., Johnson, B. E. and Lee, D. J.: Comparison of ALS inhibitor resistance and allelic interactions in shattercane accessions. Weed Sci., **47**, 275-281, 1999.
- Letouz, A., Gasquez, J., Vaccara, D., Orlando, D., Leterrier, J. L., Roy, C and Bouvard-Derieux, E.: Development of New Reliable Quick Tests and State of Grassweed Herbicide Resistance in France. BCPC-Weeds, Brighton, U.K., pp. 325-330.
- Lior, E., Sibony, M., Kiger, J. and Rubin, B. Polymorphism in the resistance of *Plantago lagopus* to herbicides. Weed Res., **40**, 457-466, 2000.
- Lovell, S. T., Wax, L. M., Horak, M. J. and Peterson, D. E.: Imidazolinone and Sulfonylurea Resistance in a Biotype of Common Waterhemp (*Amaranthus rudis*). Weed Sci., **44**, 789-794, 1996.
- Mallory-Smith, C. A., Thill, D. C. and Dial, M. J.: Identification of Sulfonylurea Herbicide-Resistant Prickly Lettuce (*Lactuca serriola*). Weed Techn., **4**, 163-168, 1990a.
- Mallory-Smith, C. A., Thill, D. C., Dial, M. J. and Zemetra, R. S.: Inheritance of Sulfonylurea Herbicide Resistance in *Lactuca spp.* Weed Techn., **4**, 787-790, 1990b.
- Mallory-Smith, C., Hendrickson, P. and Mueller-Warrant, G.: Cross-Resistance of primisulfuron-resistant *Bromus tectorum* L. (downy brome) to sulfosulfuron. Weed Sci., **47**, 256-257, 1999.
- Manley, B. S., Wilson, H. P. and Hines, T. E.: Characterization of Imidazolinone-Resistant Smooth Pigweed (*Amaranthus hybridus*). Weed Techn., **12**, 575-584, 1998.
- Manley, B. S., Singh, B. K., Shaner, D. L. and Wilson, H. P.: Imidazolinone Resistance in Smooth Pigweed (*Amaranthus hybridus*) Is Due to an Altered Acetolactate Synthase. Weed Techn., **13**, 697-705, 1999a.
- Moss, S. R.: Techniques for Determining Herbicide Resistance BCPC - Weeds, Brighton, U. K., 1995, pp. 547-556.
- Norsworthy, J. K., Talbert, R. E. and Hogland, R. E.: Chlorophyll fluorescence evaluation of agrochemical interactions with propanil on propanil-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). Weed Sci., **47**, 13-19, 1999.
- Poston, D. H., Wilson, H. P. and Hines, Th. E.: Imidazolinone resistance in several *Amaranthus hybridus* populations. Weed Sci., **48**, 508-513, 2000.
- Powles, S. B. and Shaner, D. L.: Herbicide Resistance and World Grains. CRC Press, London, New York, 2001.
- Primiani, M. M., Cotterman, J. C. and Saari, L. L. (1990): Resistance of Kochia (*Kochia scoparia*) to Sulfonylurea and Imidazolinone Herbicides. Weed Techn., **4**, 169-172, 1990.
- Reed, W. T., Saladini, J. L., Cotterman, J. C., Primiani, M. M. and Saari, L. L.: Resistance in weeds to sulfonylurea herbicides. Brighton Crop Protection Conference-Weeds, Brighton, U. K., 1989, pp. 295-300.
- Sattin, M., Berto, D. and Zanin, G.: Resistance to ALS inhibitors in weeds of rice in north-western Italy. The Brighton Conference - Weeds, Brighton, U. K., 1999, pp. 783-790.
- Sibony, M., Michel, A., Haas, H. U., Rubin, B. and Hurle, K.: Sulfometuron-resistant *Amaranthus retroflexus*: Cross-resistance and molecular basis for resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. Weed Res., **41**, 509-522, 2001.
- Smit, J. J. and Cairns, A. L. P. (2001): Resistance of *Raphanus raphanistrum* to chlorsulfuron in the Republic of South Africa. Weed Res., **41**, 41-47, 2001.
- Sprague, C. L., Stoller, E. W. and Wax, L. M.: Response of acetolactate synthase (ALS)-resistant biotype of *Amaranthus rudis* to selected ALS - inhibiting and alternative herbicides. Weed Res., **37**, 93-101, 1997a.
- Sprague, C. L., Stoller, E. W., Wax, L. M. and Horak, M. J. (1997b): Palmer amaranth (*Amaranthus palmer*) and common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistance to selected ALS - inhibiting herbicides. Weed Sci., **45**, 192-197, 1997b.
- Uchino, A., Watanabe, H., Wang, G. X. and Itoh, K.: Light Requirement in Rapid Diagnosis



---

of Sulfonylurea-Resistant Weeds of *Lindernia* spp. (Scrophulariaceae). *Weed Techn.*, **13**, 680-684, 1999.

Wagner, J., Haas, H. U. and Hurle, K.: Identification of ALS inhibitor-resistant *Amaranthus* biotypes using polymerase chain reaction amplification of specific alleles. *Weed Res.*, **42**, 280-286, 2002a.

Wagner, J., H. U. Haas, H. U. and Hurle, K.: Allele-specific PCR used for the detection of ALS inhibitor resistance in *Amaranthus* spp. 12<sup>th</sup> EWRS Symposium, Wageningen, the Netherlands, 2002b, pp. 138-139.

Walsh, M. J., Duane, R. D. and Powles, S. B.: High Frequency of Chlorsulfuron-Resistant Wild Radish (*Raphanus raphanistrum*) Populations across the Western Australian Wheatbelt. *Weed Techn.*, **15**, 199-203, 2001.

Wetzel, D. K., Horak, M. J., Skinner, D. Z. and Kulakov, P. A.: Transferal of herbicide resistance traits from *Amaranthus palmeri* to *Amaranthus rudis*. *Weed Sci.*, **47**, 538-543, 1999.

Wolf, A. D. and Liston, A.: Contributions of PCR-Based Methods to Plant Systematics and Evolutionary Biology. *Molecular Systematics of Plants - II: DNA sequencing* (D. E. Soltis, P. S. Soltis and J. J. Doyle, eds.). Kluwer Academic Publishers, 2000, pp. 43-86.

Wright, T. R. and Penner, D.: *In vitro* and whole-plant magnitude and cross-resistance characterization of two imidazolinone-resistant sugarbeet (*Beta vulgaris*) somatic cell selections. *Weed Sci.*, **46**, 24-29, 1998.

Zhang, J., Salas, M. L., Jordan, N. R. and Weller, S. C.: Biorational approaches to managing *Datura stramonium*. *Weed Sci.*, **47**, 750-756, 1999.  
<http://www.weedscience.org/in.asp>.

---

## Weed Resistance to Herbicides States, Causes and Possibilities of Preventive Resistance

### SUMMARY

Resistance occurs as a result of heritable changes to biochemical processes that enable plant survival when treated with a herbicide. Resistance can result from changes to the herbicides target site such that binding of the herbicide is reduced, or over-expression of the target site may occur. Alternatively, there may be a reduction in the amount of herbicide that reaches the target enzyme through detoxication, sequestration, or reduced absorption of herbicide. Finally, the plant may survive through the ability to protect plant metabolism from toxic compounds produced as a consequence of herbicide action. Herbicide-resistant weeds were predicted shortly after the introduction of herbicides. During the 1970s, many, additional important weed species (e.g., *Amaranthus* spp., *Chenopodium* spp., *Eriogon canadensis*, *Kochia scoparia*, *Solanum nigrum*, *Panicum crus-galli*, *Senecio vulgaris*, *Poa annua*) were reported to be resistant to triazine herbicides and several other herbicides. Over the last 10 years and now ALS-herbicide-resistant weeds account for the greatest number of resistant species and probably the largest area affected by resistance. In contrast to triazine resistance, target-site-based resistance to the ALS-inhibiting herbicides can be conferred by a number of different point mutations. Differences occur in target-site cross-resistance among the different chemical classes of herbicides that inhibit ALS. The differences are related to particular amino acid substitutions that occur within the binding region. Indeed, six different substitutions of Ala, Arg, Glu, Leu, Ser, or Tri for Pro 173 have been observed in different weed populations.

**Key words:** Weeds; Herbicides; ALS-inhibitors; Resistance

---