

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Filipa Burul

**Simulirani biotest za utvrđivanje osjetljivosti
graška (*Pisum sativum* L.) na rezidue
mezotriona**

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za herbologiju Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta pod vodstvom dr. sc. Ane Pintar i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019/2020.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	3
2.1. Mezontrion: fizikalno-kemijska i rezidualna svojstva	3
2.1.1. Fitotoksično djelovanje rezidua mezontriona na kulturne biljke.....	5
2.2. Biotest sa simuliranim reziduama herbicida	6
3. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	8
4. MATERIJALI I METODE	9
4.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka tla	9
4.2. Aplikacija mezontriona i sjetva testne kulture	9
4.3. Utvrđivanje osjetljivosti graška na simulirane rezidue mezontriona	10
5. REZULTATI I RASPRAVA	14
5.1. Vizualna ocjena fitotoksičnog oštećenja na grašku.....	14
5.2. Redukcija intenziteta fluorescencije klorofila	16
5.3. Redukcija dužine korijena graška	18
5.4. Redukcija svježih nadzemne mase graška.....	20
6. ZAKLJUČAK	22
7. ZAHVALE	23
8. LITERATURA	24
8. SAŽETAK	29
9. SUMMARY	30
ŽIVOTOPIS AUTORA	31

1. UVOD

Pesticidi su gotovo neizostavni dio poljoprivredne proizvodnje te se procjenjuje da bi bez njihove primjene oko 50 % svjetske proizvodnje hrane bilo izgubljeno (Oerke, 2005). Među štetnim organizmima, korovi nanose najveće (34 %) štete (Oerke, 2005). Sukladno tome, globalna potrošnja herbicida znatno je veća (46 %) u odnosu na potrošnju ostalih skupina pesticida (Oerke, 2005).

Nakon aplikacije većina primijenjene količine herbicida dopijeva u tlo i biva raspoređena po fazama tla, neovisno o tome da li su herbicidi primijenjeni kao zemljišna (tretiranje tla) ili folijarna (tretiranje lista) sredstva (Chaabane i sur., 2008). Prema Pimentelu (1995) manje od 0,1 % primijenjenog herbicida dopijeva do ciljnog mjesta djelovanja, dok ostatak podliježe utjecaju fizikalnih, kemijskih i bioloških procesa u tlu koji se dijele na procese gubitaka (adsorpcija/desorpcija, apsorpcija, dubinsko i površinsko otjecanje te isparavanje) i procese razgradnje (mikrobiološka, kemijska i fotokemijska razgradnja). Navedeni procesi određuju herbicidni učinak i daljnju sudbinu herbicida (Ostojić, 1989; Barriuso i Calvet, 1992), što se osobito odnosi na adsorpcijsko-desorpcijske procese (Bailey i White, 1964; Harris i Warren, 1964; Upchurch, 1966; Ostojić, 1989). Adsorpcijsko-desorpcijski procesi utječu na kretanje herbicida kroz profil tla, biodostupnost, razgradnju, isparavanje i ispiranje herbicida (Blasioli i sur., 2011), a sve navedeno utječe na duljinu perzistentnosti herbicida u okolišu (Wu i sur., 2011).

Perzistentnost se definira kao vremenski period u kojem herbicid u tlu ostaje u aktivnom obliku (Ostojić, 1989) te predstavlja sposobnost herbicida da zadrži svoja fizikalna, kemijska i fitotoksična (fitocidna) svojstva kroz određeno vremensko razdoblje nakon aplikacije (Guimarães, 1987). Mjeri se poluvijekom raspada (DT_{50}) koji označava vrijeme potrebno da se primijenjena doza herbicida razgradi na polovicu (Ostojić 1989; Helling, 2005). Perzistentnost je svojstvena prvenstveno zemljišnim herbicidima od kojih se i očekuje da imaju produženo (rezidualno) djelovanje te da određeno vrijeme ostaju aktivni u tlu i pružaju zaštitu usjevu od korova (Ostojić, 1989). Prema Ostojiću (1989) idealan bi herbicid bio onaj čija bi perzistentnost osigurala da kroz kritično razdoblje zakorovljenosti oslobodi kulturu od korova, a da istovremeno u tlu ne ostavlja rezidue koje bi mogle štetiti narednoj kulturi. Herbicidi s naglašenim perzistentnim djelovanjem često ostavljaju aktivne rezidue u tlu sve do žetve ili čak nakon žetve, što ima brojne štetne posljedice na poljoprivrednu proizvodnju i tlo (Pintar i sur., 2017). Rezidue takvog herbicida mogu djelovati fitotoksično na osjetljive kulture koje slijede u plodored, a time suziti plodored. Osim toga, mogu doprinijeti akumulaciji herbicida u tlu i biljnim proizvodima, ali i nepovoljno utjecati na mikroorganizme tla (Ostojić, 1989). Budući da perzistentnost nije stalna vrijednost nekog herbicida, već rezultat kompleksne interakcije njegovih fizikalno-kemijskih svojstava i raznih čimbenika u okolišu (značajke tla, vremenske prilike, agrotehničke mjere), u određenim uvjetima jednako negativno djelovanje utvrđeno je i kod nekih neperzistentnih herbicida, poput mezo-triona.

Mezotrion je zemljišni i folijarni herbicid registriran za suzbijanje korova u kukuruzu. Temeljem vrijednosti poluvijeka raspada (4-44 dana) svrstan je u skupinu neperzistentnih herbicida zbog čega se pretpostavlja da neće djelovati fitotoksično na kulture koje slijede u plodoredu (Lewis i sur., 2016). U ograničenjima plodoreda nakon primjene mezotriona stoji da se 24 mjeseca nakon primjene na istoj površini ne smiju sijati šećerna i stočna repa, cikla, salata, špinat, grašak, grah te ostale *Phaseolus* i *Vicia* vrste (FIS, 2020). Međutim, brojnim istraživanjima je utvrđeno da perzistentnost mezotriona u različitim pedo-klimatskim uvjetima okoliša može značajno varirati (Dyson i sur, 2002; Torma i sur., 2004; Felix i sur., 2007; Soltani i sur, 2007; Chabaane i sur., 2008; Robinson, 2008; Su i sur., 2017). Stoga, da bi se izbjegla fitotoksična oštećenja na osjetljivim kulturama, preporučuje se provedba metoda utvrđivanja rezidua herbicida u tlu (Riddle i sur., 2013). U tu svrhu primjenjuju se analitičke i biotest metode kojima se nastoje utvrditi preostale količine herbicida u tlu. Analitičke metode obuhvaćaju tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC), plinsku kromatografiju (eng. *gas chromatography*, GC), kapilarnu elektroforezu (eng. *capillary electrophoresis*, CE) i imunološke testove (eng. *immunoassays*). Navedene metode detektiraju prisutnost, vrstu i sastav kemijske tvari (herbicida) u tlu (Sekutowski, 2011). Međutim, one ne daju informaciju o dostupnosti rezidua herbicida biljkama (O'Sullivan, 2005). Hance (1987) navodi da poznavanje prisutne koncentracije herbicida u tlu nije dovoljno za predviđanje fitotoksičnog djelovanja na osjetljivu kulturnu biljku te da je odgovor o biodostupnosti rezidua herbicida moguće dobiti jedino primjenom biotest metoda.

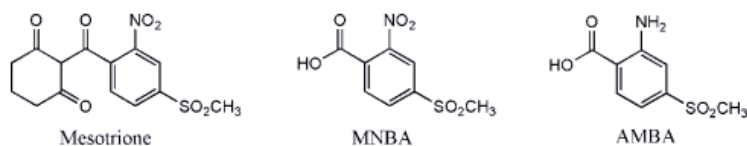
Biotest metode (grč. *bios* – život, lat. *testari* – pokazatelj) definiraju se kao niz metoda kojima se korištenjem biološkog uzorka (osjetljivi organizam) utvrđuje prisutnost neke toksične tvari u okolišu utvrđivanjem (mjenjenjem) odgovora osjetljivog organizma na prisutnost ispitivane toksične tvari (Stek i sur., 1989). Riječ je o jednostavnoj metodi kojom se utvrđuje da li je „sigurno“ obaviti sjetvu ili sadnju kulture na površini na kojoj je prethodno primijenjen herbicid na koji je ta ista kultura osjetljiva. Prema tome, na temelju rezultata biotest metode moguće je donijeti vjerodostojnu odluku o sjetvi naredne kulture u plodoredu (Pintar i sur., 2017).

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Mezotrion: fizikalno-kemijska i rezidualna svojstva

Mezotrion [2-(4-metil-2-nitrobenzoil)cikloheksan-1,3-dion] je zemljišni i folijarni herbicid iz kemijske skupine triketona koji se primjenjuje u kukuruzu za suzbijanje širokolisnih i nekih uskolisnih korova (Rouchaud i sur., 2000; Mitchell i sur., 2001). Primjenjuje se prije nicanja (eng. *pre-emergence*, pre-em) i nakon nicanja (eng. *post-emergence*, post em) kulture i korova. Doza primjene u pre-em roku iznosi 250-300 g ha⁻¹, dok je u post-em roku doza nešto niža i iznosi 150-250 g ha⁻¹ (Barić i Ostojić, 2020). Pri jakoj zakorovljenosti jednogodišnjim uskolisnim vrstama, radi proširenja spektra djelovanja, kombinira se s drugim učinkovitim herbicidima (Radivojević i sur., 2014; Barić i Ostojić, 2020). Suzbija većinu važnijih jednogodišnjih širokolisnih korova poput loboda (*Chenopodium spp.*), čička (*Xanthium strumarium* L.), europskog mračnjaka (*Abutilon theophrasti* Medik.), ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia* L.), šćireva (*Amaranthus spp.*), dvornika (*Polygonum spp.*), kužnjaka (*Datura stramonium* L.) i crne pomoćnice (*Solanum nigrum* L.) (Wichert i sur., 1999; Abendroth i sur., 2006; Barić i Ostojić, 2020). Suzbija i neke jednogodišnje travne korove poput koštana (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.), svračice (*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.) i jednogodišnje vlasnjače (*Poa annua* L.) (Wichert i sur., 1999; Mitchell i sur., 2001).

Selektivnost mezotriona prema kukuruzu zasniva se na sporijem usvajanju i brzoj razgradnji do netoksičnih odnosno herbicidno neaktivnih produkata: 4-metilsulfonyl-2-nitrobenzojeve kiseline (MNBA) i 2-amino-4-(metilsulfonyl) benzojeve kiseline (AMBA) (Armel i sur., 2005) čija je struktura prikazana na slici 1. Kod osjetljivih korovnih vrsta usvajanje se odvija puno brže (Mitchell i sur., 2001; Radivojević i sur., 2014). Sat vremena nakon folijarne primjene korovne biljke usvoje 55-90 % ukupno primijenjene doze mezotriona, a nakon 24 sata 70 % apsorbirane doze uspješno se translocira kroz biljku (Wichert i sur., 1999).



Slika 1. Kemijska struktura mezotriona i MNBA i AMBA razgradnih produkata

Izvor: Durand i sur., 2016.

Herbicidna aktivnost mezotriona zasniva se na inhibiciji biosinteze karotenoida blokiranjem enzima 4-hidroksifenilpiruvat dioksigenaze (4-HPPD) (Mitchell i sur., 2001). 4-HPPD je ključan enzim u biosintezi karotenoida (Romdhane i sur., 2019). Odgovoran je za kataliziranje pretvorbe p-hidroksifenil piruvata (4-HPP) u homogenizat (HGA) (Crouch i sur., 1997). HGA je prekursor α -tokoferola i plastokinona (PQ) koji su osnovni kofaktori fitoen desaturaze (PDS) (Riddle, 2012; Carles

i sur., 2017). PDS je ključan enzim u biosintetskom putu karotenoida (Koschmieder i sur., 2017). Inhibicijom enzima 4-HPPD dolazi do redukcije sadržaja plastokinona u biljnim stanicama čime je blokiran i sam proces biosinteze karotenoida (Beaudegnies i sur., 2009). Navedeno se vizualno očituje izbjeljivanjem biljnog tkiva (slika 2) što je tipični simptom djelovanja mezotriona (Beaudegnies i sur., 2009). Nakon izbjeljivanja slijedi nekroza meristemskog tkiva i venuće cijele biljke. Prvi simptomi javljaju se nakon tri do pet dana, dok do potpunog propadanja biljaka dolazi unutar dva do tri tjedna (Wichert i sur., 1999; Beaudegnies i sur., 2009).



Slika 2. Simptom djelovanja mezotriona
(foto: Burul, F.)

Mezotrion je klasificiran kao neperzistentan herbicid s vremenom poluraspada (DT_{50}) od 4 do 44 dana (Lewis i sur., 2016). Međutim, okolišni čimbenici poput tipa tla i vremenskih prilika u velikoj mjeri utječu na perzistentnost mezotriona (Barchanska i sur., 2017) te se pokazalo da vrijeme poluraspada mezotriona u određenim pedoklimatskim uvjetima može biti znatno dulje (Chabaane i sur., 2008; Dyson i sur., 2002; Felix i sur., 2007; Carles i sur., 2017; Su i sur., 2017). Prethodnim istraživanjima je utvrđeno da najveći utjecaj na poluvijek raspada mezotriona ima pH tla (Dyson i sur., 2002; Carles i sur., 2017). U istraživanju Dyson i sur. (2002) vrijednost DT_{50} mezotriona kretala se od 4,5 dana u tlu niže (5,0) pH vrijednosti do 32 dana u tlu više (7,1) pH vrijednosti. U istraživanju Rouchaud i sur. (2000) razgradnja mezotriona varirala je s obzirom na teksturu tla. Razgradnja je proučavana u tlima približno jednake pH vrijednosti (pH 6,4-6,8) i sadržaja organske tvari (1,45-1,94 %), ali različite teksture. U pjeskovitom tlu, 90 % od ukupno primijenjene količine mezotriona, razgradilo se nakon 3,6 mjeseci, dok se u praškastoj ilovači, ilovači i glinastom tlu razgradilo nakon 4,7 mjeseci. Su i sur. (2017) ističu utjecaj sadržaja vlage u tlu i temperature tla na perzistentnost mezotriona.

Temeljem utvrđenih rezultata 90 dana nakon primjene mezotriona, u tlu vlažnosti 60 % razgradilo se 98 % ukupno primijenjene količine mezotriona, 81 % u tlu sadržaja vlage 40 % te 52 % u tlu s najmanjim sadržajem vlage (15 %). Prema rezultatima istraživanja utjecaja temperature tla, u tlu temperature 15 °C, 21 dan nakon primjene, nerazgrađene količine mezotriona iznosile su 81 %, dok su u tlu temperature 25 iznosile 31 %, odnosno 25 % pri temperaturi od 35°C.

S obzirom na važnost uloge fizikalno-kemijskih svojstava herbicida u procesu adsorpcije, brojni autori izdvajaju topljivost u vodi (S_w), hidrofobnost ($\log K_{ow}$) i konstantu ionizacije (pK_a) kao važne pokazatelje sposobnosti vezanja herbicida za čestice tla (Devlin i sur., 2002; Maurice, 2005; Kerle i sur., 2007; Mitrić i sur., 2016; Pintar i sur., 2017). Prema Lewis i sur. (2016) topljivost (S_w) mezotriona pri 20°C iznosi 1 500 mg L⁻¹ što ukazuje na visoku topljivost u vodi. Koeficijent razdjeljenja u sustavu n-oktanol/voda ($\log K_{ow}$) pri temperaturi od 20°C i pH 7 iznosi 0,11 što ukazuje na nisku sklonost akumulacije mezotriona u tlu. Prema tome, radi se o herbicidu visoke pokretljivosti i smanjene adsorpcije u tlu (Mendes i sur., 2017). Prema vrijednosti konstante disocijacije (pK_a) koja iznosi 3,12 mezotriion se ponaša kao slaba kiselina (Mithcell i sur., 2001). Povećanjem pH vrijednosti tla disocira iz molekulskog u anionski oblik pri čemu mu se intenzitet adsorpcije snižava. Pri pH vrijednosti ispod 3,1 mezotriion se nalazi u molekulskom obliku što ga čini podložnim za adsorpciju na koloide tla. Pri pH iznad 3,1 nalazi se u anionskom obliku koji je podložniji razgradnji (Burnside i sur., 1969; Rouchaud i sur., 2000; Dyson i sur., 2002).

2.1.1. Fitotoksično djelovanje rezidua mezotriona na kulturne biljke

Hrvatski službeni podaci ograničenja plodoreda nakon primjene mezotriona navode da se 24 mjeseca nakon primjene pripravka na osnovi mezotriona (Callisto 480 SC®) na istoj površini ne smiju sijati šećerna repa (*Beta vulgaris* L. var. *saccharifera* Alef.), stočna repa (*Beta vulgaris* L. spp. *crassa* Alef.), cikla (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*), salata (*Lactuca sativa* L.), špinat (*Spinacia oleracea* L.), grašak (*Pisum sativum* L.), grah (*Phaseolus vulgaris* L.) i ostale vrste roda *Phaseolus* i *Vicia* (FIS, 2020). Proizvođači često u plodoredu s kukuruzom uzgajaju povrtlarske kulture da bi prekinuli životni ciklus štetnih organizama (Soltani i sur., 2007; Riddle i sur., 2013). No, prema Felix i sur. (2007) utvrđeni su brojni slučajevi fitotoksičnog učinka rezidua mezotriona na povrtlarske kulture u plodoredu. Felix i sur. (2007) istraživali su utjecaj rezidua mezotriona na nekoliko povrtlarskih kultura godinu dana nakon primjene u kukuruzu u pre-em i post-em roku. Najosjetljivijom kulturom prema istraživanim parametrima (stupanj oštećenja i prinos) pokazao se grah. Primjenom dva (420 g a. t. ha⁻¹) i četiri (840 g a. t. ha⁻¹) puta veće doze od propisane u pre-em roku, odnosno dva (210 g a. t. ha⁻¹) i četiri (420 g a. t. ha⁻¹) puta veće doze u post-em roku utvrđen je stupanj oštećenja od 95-96 %. Oštećenje se uglavnom očitovalo u reduciranom rastu i klorozi na listovima. Navedeni stupanj oštećenja nastao primjenom četiri puta veće doze naposljetku je doveo do potpunog izostanka prinosa. Primjenom dva (210 g a. t. ha⁻¹) i četiri (420 g a. t. ha⁻¹) puta veće doze u pre-em roku prinos je bio reduciran za 94 % (210 g a. t. ha⁻¹) i

99 % (420 g a. t. ha⁻¹) . Primjenom mezotriona u post-em roku gubici prinosa bili su nešto manji te je prinosa bio reduciran za 81, 85 i 96 % primjenom preporučene (105 g a. t. ha⁻¹), dva (210 g a. t. ha⁻¹) i četiri (420 g a. t. ha⁻¹) puta veće doze. Soltani i sur. (2007) zabilježili su razlike u osjetljivosti različitih kultivara graha na rezidue mezotriona. Istraživali su utjecaj mezotriona primijenjenog prethodne godine u pre-em (175 i 350 g a. t. ha⁻¹) i post-em (100 i 200 g a. t. ha⁻¹) roku na crveni, šareni, crni i bijeli grah. Godinu dana nakon primjene mezotriona pri obje istraživane doze u pre-em i post-em roku, na kultivarima crnog i bijelog graha utvrđena su minimalna vizualna oštećenja (6 %). Međutim, na šarenom grahu pri dozi od 175 i 350 g a. t. ha⁻¹ godinu dana nakon primjene iznosila su 23 % (175 g a. t. ha⁻¹) odnosno 36 % (350 g a. t. ha⁻¹) oštećenja. Na crvenom grahu primjenom obje doze zabilježena su manja vizualna oštećenja od 3 (175 g a. t. ha⁻¹) i 15 % (350 g a. t. ha⁻¹). Veća fitotoksična oštećenja zapažena su na šarenom i crvenom grahu godinu dana nakon primjene u post-em roku. Tada je šarenom grahu pri dozi od 100 g a. t. ha⁻¹ oštećenje iznosilo 40 %, odnosno 42 % (200 g a. t. ha⁻¹). Na crvenom grahu su oštećenja bila nešto manja te su iznosila 27 % (100 g a. t. ha⁻¹) i 31 % (200 g a. t. ha⁻¹). Obzirom na rezultate i utvrđene razlike u osjetljivosti kultivara graha, autori ističu potrebu prilagodbe ograničenja plodoreda s naglaskom na pojedine kulture, te tako predlažu period od 12 mjeseci za crni i bijeli grah i 24 mjeseca za crveni i šareni grah.

2.2. Biotest sa simuliranim reziduama herbicida

Biotest sa simuliranim reziduama herbicida predstavlja metodu utvrđivanja rezidua herbicida u tlu primjenom reduciranih doza herbicida, kojima se nastoje simulirati nerazgrađene količine herbicida koje zaostaju u tlu tijekom razdoblja nakon njegove primjene u polju (Barnes i Lavy, 1991; Rabaey i Harvey; Riddle i sur., 2013). Biotest se može provesti izravno u polju odnosno u stakleniku ili u laboratoriju (u kontroliranim uvjetima) na uzorcima uzetim iz polja (Ostojić, 2004). Istraživani herbicidi mogu se primijeniti direktno na tlo ili folijarno (Sekutowski, 2011). Za oba načina provođenja, potrebno je odabrati odgovarajuću testnu biljku i parametar za procjenu osjetljivosti testne biljke (Pintar i sur., 2017). Testna biljka mora posjedovati relativnu osjetljivost na istraživani herbicid, mora se odlikovati relativno brzim i ujednačenim nicanjem kao i ujednačenim rastom i brzom tvorbom organske mase (de Souza, 1999; Sekutowski, 2011). Vrlo je važno da testna biljka reagira lako uočljivim i mjerljivim simptomima te da utvrđena reakcija biljke bude ponovljiva (Günther i sur., 1993). Kao testne biljke uglavnom se koriste kulturne biljke koje u odnosu na korove imaju malu genetsku varijabilnost. To svojstvo omogućava ponovljivost reakcije (Günther i sur., 1993). Odluka o odabiru parametra za procjenu osjetljivosti donosi se na osnovi nastalih vizualnih oštećenja. To često uključuje utvrđivanje duljine korijena, stabljike, lista, te vaganje svježe i/ili suhe mase biljaka. Mjerenja također mogu i uključivati ocjenu fiziološke reakcije biljaka (Pintar i sur., 2020). Odabir reakcije ovisi o mehanizmu djelovanja istraživanog herbicida te se može odnositi na utvrđivanje potrošnje vode, apsorbanciju izlučivanog klorofila, klijavost sjemena, izmjenu CO₂, utvrđivanje sadržaja karotenoida i dr. (Witt i sur.,

1970; Truelove i sur., 1974; Horowitz, 1976; Blacklow i Pheloung, 1991; Schmidt, 1993; Pintar i sur., 2020). Na taj način moguće je utvrditi da li je „sigurno“ obaviti sjetvu ili sadnju kulture na površini na kojoj je prethodno primijenjen herbicid na koji je ta ista kultura osjetljiva. Prema tome, na temelju rezultata biotesta moguće je utvrditi utjecaj eventualnih zaostalih količina herbicida u tlu na osjetljivu kulturu i donijeti odluku o sjetvi naredne kulture u plodoredu (Pintar i sur., 2017).

3. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Istraživanje polazi od **hipoteze** da će se osjetljivost graška razlikovati ovisno o primijenjenim količinama simuliranih rezidua meotriona.

Opći cilj istraživanja je utvrditi razinu fitotoksičnog učinka simuliranih rezidua meotriona na grašak.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Utvrditi količinu simuliranih rezidua meotriona koja kod graška uzrokuje 50, 70 i 90 % redukcije intenziteta fluorescencije klorofila, dužine korijena i svježe nadzemne mase.
2. Utvrditi koji od istraživanih parametara osjetljivosti je najbolji pokazatelj fitotoksičnog učinka simuliranih rezidua meotriona na grašak.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka tla

Početkom ožujka 2020. godine s lokacije Šašinovečki Lug uzeti su uzorci tla dubine 0-20 cm. Uzorci su uzeti sondom (Eijkelkamp®, Netherlands) s više pravilno raspoređenih netretiranih dijelova parcele. Mehanički sastav i kemijska svojstva uzorkovanog tla prikazani su u tablici 1. Nakon uzorkovanja, uzorci su preneseni u prostoriju u kojoj su se sušili 72 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega su prosijani kroz sita promjera 5 mm. Nakon prosijavanja, odvagano je po 200 g svakog uzorka i ravnomjerno raspoređeno u plastične posudice promjera 10 cm.

Tablica 1. Mehanički sastav i kemijska svojstva istraživanog tla

Sadržaj mehaničkih čestica tla (%)				
Krupni pijesak 2,0-0,2 mm	Sitni pijesak 0,2-0,063 mm	Krupni prah 0,063-0,02 mm	Sitni prah 0,02-0,002 mm	Glina <0,002 mm
2,5	9,1	31,1	35,8	21,5
Kemijska svojstva				
Humus (%)	OC (%)	pH (H₂O)	pH (KCl)	CEC (cmol kg⁻¹)
2,7	1,3	8,2	7,28	21,8

4.2. Aplikacija mezotriona i sjetva testne kulture

U praktikumu Zavoda za herbologiju Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta obavljena je sjetva testne kulture (graška). U svaku posudicu, na dubinu od 4 cm, posijano je pet sjemenki graška ('Picar'). Nakon sjetve, pomoću TLC Sprayera (CAMAG®, Switzerland), obavljena je aplikacija mezotriona (slika 3).



Slika 3. Aplikacija mezotriona pomoću TLC Sprayera
(foto: Burul, F.)

Mezotrion (Callisto® 480 SC) je primijenjen u reduciranim dozama od 2,3 (1/64 R); 4,5 (1/32 R); 9,0 (1/16 R); 18 (1/8 R); 24 (1/6 R); 36 (1/4 R) i 72 (1/2 R) g a. t. ha⁻¹, pri čemu je R (eng. *recommended*) preporučena (144 g a. i. ha⁻¹) doza mezotriona koja se primjenjuje u polju. Navedenim dozama simulirane su rezidue mezotriona koje se, s obzirom na njegov poluvijek raspada u poljskim uvjetima, mogu očekivati u tlu tijekom vremena nakon njegove primjene. Svaka doza priprema, uključujući i kontrolnu varijantu (0 g a. t. ha⁻¹), postavljena je u četiri repeticije, a dizajn pokusa bio je slučajni blokni raspored.

Nakon tretiranja, posude sa sjemenkama graška prenesene su u plastenik gdje su radi održavanja količine vlage na razini poljskog vodnog kapaciteta tla redovito zalijevane s 30 mL vode po uzgojnoj posudi.

4.3. Utvrđivanje osjetljivosti graška na simulirane rezidue mezotriona

Osjetljivost graška na simulirane rezidue mezotriona višekratno je utvrđivana, 14, 28 i 35 dana nakon sjetve (DNS) graška, vizualnom ocjenom fitotoksičnog učinka prema skali od 0 do 100 % [EPPO standard PP 1/135 (4)]. Prema spomenutoj skali ocjena 0 % označava da na grašku nisu uočeni fitotoksični učinci mezotriona, dok ocjena 100 % podrazumijeva potpuno propale biljke.

Osim vizualne ocjene, osjetljivost je utvrđivana i primjenom objektivnih parametara za koje se smatra da su realniji pokazatelji osjetljivosti graška na simulirane rezidue mezotriona. Spomenuti parametri su uključivali mjerenje intenziteta fluorescencije klorofila, mjerenje dužine korijena i utvrđivanje svježe nadzemne mase biljaka graška.

Mjerenje intenziteta fluorescencije klorofila obavljeno je 35 DNS graška pomoću Plant Stress

Kit (ADC BioScientific Ltd., UK) uređaja kao što je prikazano na slici 4. Po svakoj biljci izvršeno je pet mjerenja. Prema Murchie i Lawson (2013) riječ je o neinvazivnoj metodi mjerenja intenziteta fotosinteze odnosno aktivnosti fotosustava II (PSII). Navedena metoda osim što omogućava bolje razumijevanje mehanizma fotosinteze, daje uvid o reakciji biljaka na okolišne promjene putem podatka o intenzitetu fluorescencije klorofila.



Slika 4. Mjerenje intenziteta fluorescencije klorofila u biljkama graška
(foto: Burul, F.)

Dužina korijena i svježa nadzemna masa biljaka graška utvrđeni su 35 DNS u uzgojne posude. Svaka biljka graška položena je na milimetarski papir te joj je ravnalom izmjerena dužina korijena (slika 5).



Slika 5. Utvrđivanje dužine korijena graška (foto: Burul, F.)

S ciljem utvrđivanja svježe nadzemne mase, nadzemni dio svake biljke graška odstranjen je škarama, nakon čega je digitalnom vagom utvrđena masa svih pet biljaka po uzgojnoj posudi odnosno tretmanu (slika 6).



Slika 6. Utvrđivanje svježe nadzemne mase graška
(foto: Burul, F.)

4.4. Statistička obrada podataka

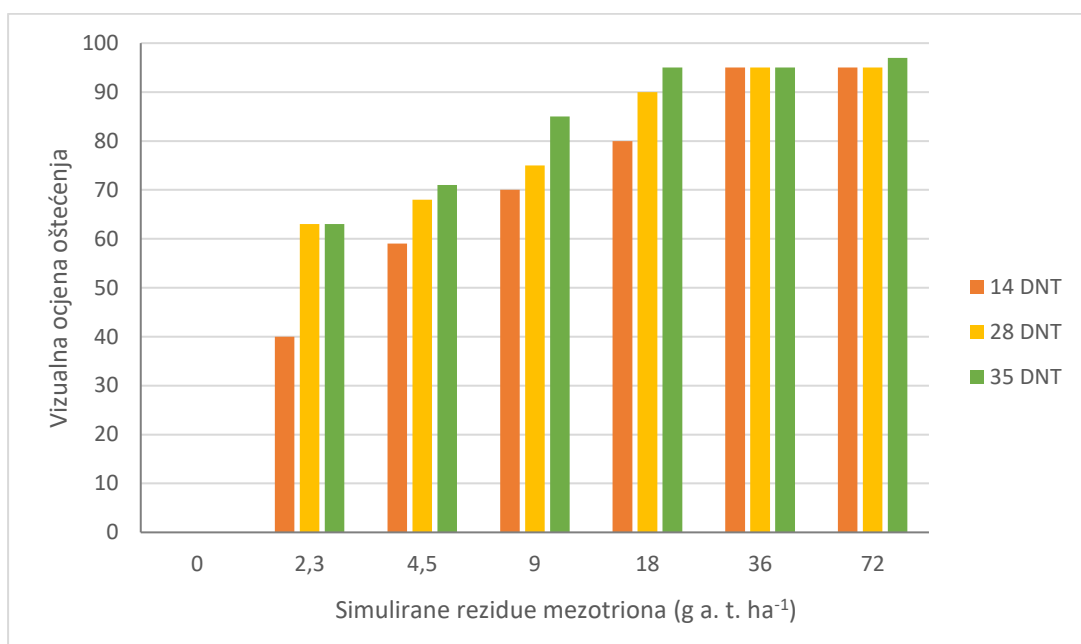
Statistička analiza rezultata provedena je analizom varijance u programu SAS 8.0 koristeći MIXED MODEL PROCEDURE (SAS Inst., 1997). Vizualne ocjene oštećenja statistički su obrađene kao mjerenja ponovljena kroz vrijeme. U analizi varijance za redukciju fluorescencije klorofila, dužine korijena i svježe nadzemne mase, tlo i tretmani smatrani su fiksnim efektom, a repeticije slučajnim efektom. Nakon signifikantnog F-testa ($P=0,05$), za usporedbu srednjih vrijednosti korišten je LSD test za $P=0,05$.

5. REZULTATI I RASPRAVA

Osjetljivost graška na simulirane rezidue mezotriona izražena je kroz vizualnu ocjenu fitotoksičnog oštećenja 14, 28 i 35 DNS graška, te redukciju intenziteta fluorescencije klorofila, dužine korijena i svježe nadzemne mase biljaka graška.

5.1. Vizualna ocjena fitotoksičnog oštećenja na grašku

Vizualne ocjene fitotoksičnog učinka simuliranih rezidua mezotriona obrađene su i prikazane zajedno za sva tri vremena (14, 28 i 35 DNS) ocjenjivanja (grafikon 1).

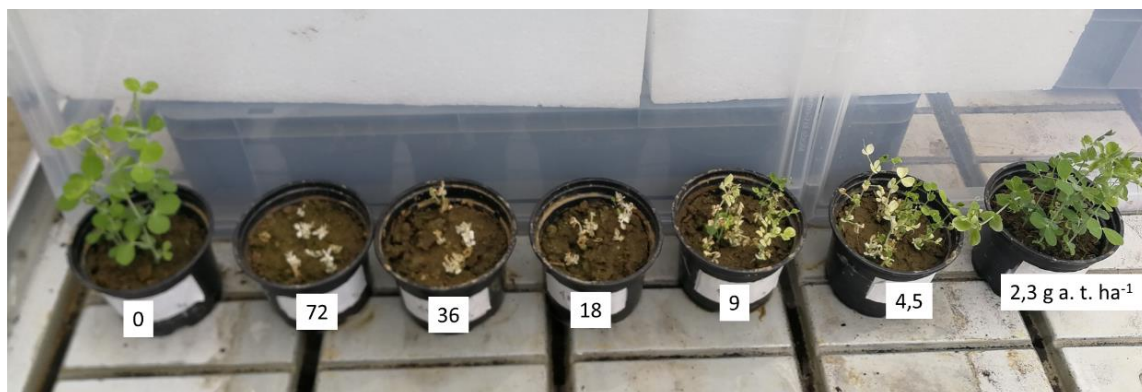


$LSD_{0,05}(T \times VO) = 3,8$ za usporedbu srednjih vrijednosti između tretmana i vremena ocjenjivanja

Grafikon 1. Vizualna ocjena fitotoksičnog učinka simuliranih rezidua mezotriona 14, 28 i 35 dana nakon sjetve graška

Prilikom prvog (14 DNS) ocjenjivanja biljke graška na kontroli (0 g a. t. ha⁻¹) nalazile su se u fazi 17 prema BBCH skali. Tada su utvrđena fitotoksična oštećenja koja su se kretala od 40 % kod najmanje (2,3 g a. t. ha⁻¹) količine simuliranih rezidua do 95 % kod količine simuliranih rezidua od 36 i 72 g a. t. ha⁻¹. Prilikom drugog (28 DNS) ocjenjivanja, kad se grašak nalazio u BBCH fazi 19, utvrđen je porast oštećenja u odnosu na prethodno (14 DNS) ocjenjivanje. Tada su se oštećenja kretala od 63 % (2,3 g a. t. ha⁻¹) do 90 % (18 g a. t. ha⁻¹). Razlike u stupnju oštećenja, u odnosu na ocjenjivanje 14 DNS, nisu utvrđene samo kod primjene 36 i 72 g a. t. ha⁻¹ te su na oba tretmana oštećenja iznosila 95 %. Kod posljednjeg (35 DNS) ocjenjivanja grašak se nalazio u fazi BBCH 21. Fitotoksična oštećenja nisu se značajno razlikovala u odnosu na prethodno (28 DNS) ocjenjivanje, osim kod količine simuliranih rezidua mezotriona od 9 i 18 g a. t. ha⁻¹. Na oba navedena tretmana prilikom posljednjeg (35 DNS)

ocjenjivanja utvrđena su najveća fitotoksična oštećenja, a očitovala su se u vidu izbjeljivanja nadzemne biljne mase, tipičnom simptomu mehanizma djelovanja mezotriona (slika 7).

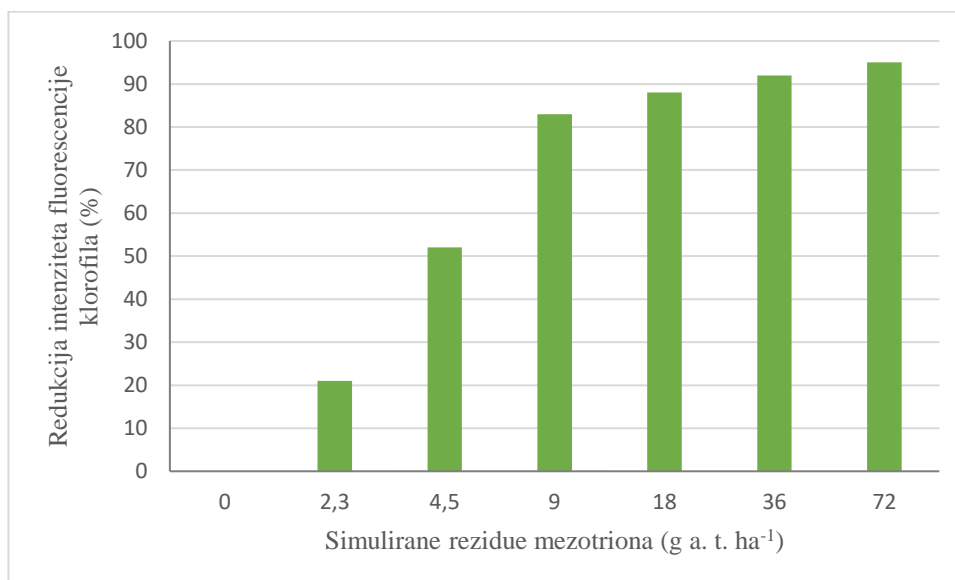


Slika 7. Vizualna ocjena oštećenja utvrđena 35 dana nakon sjetve graška
(foto: Burul, F.)

U istraživanju Riddle i sur. (2013) fitotoksična oštećenja na grašku pojavila su se 21 dan nakon aplikacije mezotriona. Oštećenja su se također očitovala u vidu izbjeljivanja, kloroze i nekroze tkiva. Vizualnom ocjenom utvrđena su oštećenja u rasponu od 1 do 73 % primjenom simuliranih rezidua mezotriona u količinama od 7 do 56 g a. t. ha⁻¹. Međutim, 39 dana nakon aplikacije stupanj oštećenja se smanjio te se kretao od 1 do 40 % primjenom istih reduciranih doza. Prva fitotoksična oštećenja na šećernoj repi u istraživanju Pintar i sur. (2020) zabilježena su 7 dana nakon aplikacije mezotriona. Oštećenja su se kretala u rasponu od 1 (1,1 g a. t. ha⁻¹) do 85 % (36 g a. t. ha⁻¹) na livadsko fluvijalnom tlu. Na hipoglej mineralnom tlu oštećenja su bila manje izražena te su se kretala od 5 (4,5 g a. t. ha⁻¹) do 83 % (36 g a. t. ha⁻¹). Nakon 14 dana, oštećenja su dosegla 96 % na livadsko fluvijalnom tlu kod količine simuliranih rezidua od 24 g a. t. ha⁻¹ te 95 % kod količine od 36 g a. t. ha⁻¹ na hipoglej mineralnom tlu. Nakon 21 dan na livadsko fluvijalnom tlu biljke su potpuno propale uslijed rezidua u količini od 18 g a. t. ha⁻¹. Na hipoglej mineralnom tlu potpuno propadanje biljaka zabilježeno je pri većoj količini (24 g a. t. ha⁻¹) simuliranih rezidua mezotriona. Slični rezultati zabilježeni su u istraživanju Riddle i sur. (2013) kad je 39 dana nakon aplikacije simuliranih rezidua mezotriona u količini od 7 do 56 g a. t. ha⁻¹ zabilježeno oštećenje na šećernoj repi u rasponu od 58 do 98 %.

5.2. Redukcija intenziteta fluorescencije klorofila

Mjerenje intenziteta fluorescencije klorofila obavljeno je prilikom posljednjeg (35 DNS) vizualnog ocjenjivanja, a rezultati su prikazani kroz redukciju intenziteta fluorescencije klorofila biljaka na tretmanima u odnosu na biljke graška na kontroli (grafikon 2).



LSD 0,05 = 5,7 za usporedbu utjecaja tretmana na redukciju intenziteta fluorescencije klorofila

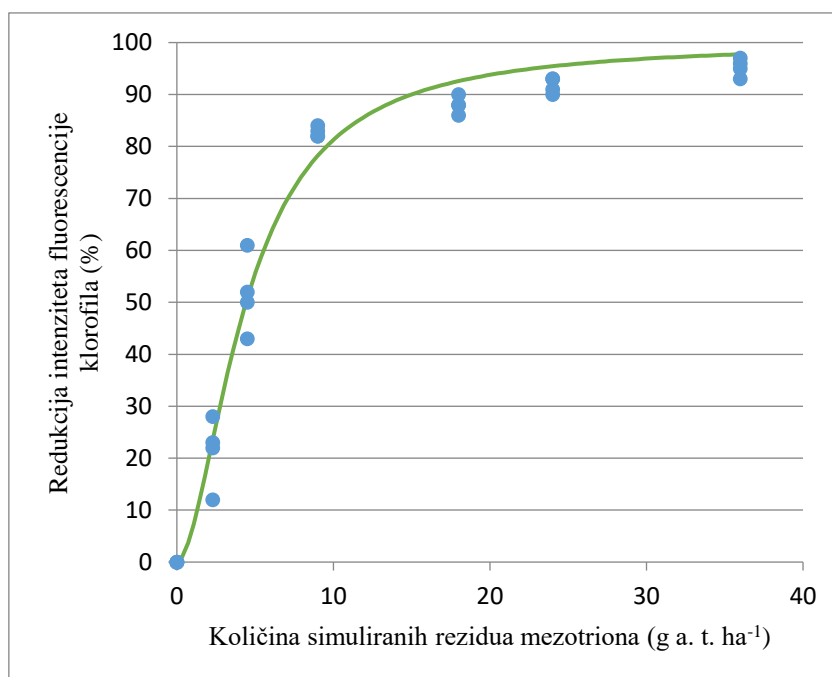
Grafikon 2. Utjecaj simuliranih rezidua mezotriona na redukciju intenziteta fluorescencije klorofila kod graška

Iz rezultata prikazanih u grafikonu 2. vidljivo je da je na svim tretmanima utvrđena značajna redukcija intenziteta fluorescencije klorofila u odnosu na kontrolu. Porastom količine simuliranih rezidua, postotak redukcije se povećavao. Značajne razlike u redukciji između tretmana utvrđene su samo kod primjene simuliranih rezidua u količini od 2,3 (21 %), 4,5 (52 %) i 9 (83 %) g a. t. ha⁻¹.

Mnogi autori ističu važnost mjerenja intenziteta fluorescencije klorofila odnosno intenziteta fotosinteze u određivanju fitotoksičnog djelovanja herbicida na biljke (Sousa i sur., 2014, Su i sur., 2018). U istraživanju Sousa i sur. (2014) rezidue herbicida iz skupine imidazolinona (inhibitori acetolaktat sintaze – ALS herbicidi) uzrokovale su redukciju intenziteta fotosinteze i prije pojave vidljivih fitotoksičnih oštećenja na biljkama riže. Su i sur. (2018) navode značajnu redukciju intenziteta fotosinteze kod različitih kulturnih biljaka uslijed prisutnosti rezidua bensulfuron-metila u količini od 50 µg kg⁻¹. Iako inhibicija fotosinteze nije primarni mehanizam djelovanja ALS herbicida, inhibiranje drugih metaboličkih procesa u biljci povezanih s fotosintezom dolazi do poremećaja fotosintetske aktivnosti u biljci (Xia i sur., 2006; Silva i sur., 2009). Naime, svjetlosna energija apsorbirana od strane molekula klorofila može biti iskorištena u samom procesu fotosinteze, višak energije može biti otpušten u obliku topline ili može biti ponovo emitiran kao svjetlost u obliku fluorescencije klorofila (Maxwell i Johnson, 2000; Murchie i Lawson, 2013). Navedeni procesi nalaze se u kompeticiji za svjetlosnu

energiju te povećanje efikasnosti jednog od procesa rezultira smanjenjem efikasnosti druga dva procesa. Stoga, mjerenjem efikasnosti fluorescencije klorofila moguće je dobiti uvid u promjene efikasnosti procesa fotosinteze i otpuštanja topline (Maxwell i Johnson, 2000). Pintar i sur. (2020) su istraživali utjecaj simuliranih rezidua mezotriona primijenjenih na dva tipa tla na ukupan sadržaj karotenoida u šećernoj repi. Prema rezultatima istraživanja redukcija ukupnog sadržaja karotenoida kretala se od 16 ($1,1 \text{ g a. t. ha}^{-1}$) do 100 % ($36 \text{ g a. t. ha}^{-1}$) na hipoglej mineralnom tlu, te od 40 ($1,1 \text{ g a. t. ha}^{-1}$) do 100 % ($36 \text{ g a. t. ha}^{-1}$) na livadsko fluvijalnom tlu. Veću redukciju na livadsko fluvijalnom tlu autori objašnjavaju većim koeficijentom adsorpcije (K_{OC}) hipoglej mineralnog (56,4) u odnosu na livadsko fluvijalno (41,8) tlo. Osim toga, u livadsko fluvijalnom tlu prevladavao je veći sadržaj čestica pijeska (11,6 %) i praha (66,9 %) u odnosu na veći sadržaj gline (39,3) i humusa (4,2) u hipoglej mineralnom tlu. Stoga, niži adsorpcijski potencijal livadsko fluvijalnog tla ukazuje na veću količinu dostupnog mezotriona u tlu kojeg biljke mogu usvojiti, a time i na veća fitotoksična oštećenja na osjetljivim kulturama.

Na osnovi podataka prikazanih u grafikonu 2, izvedena je krivulja osjetljivosti (grafikon 3) te su izračunate ED_{50} , ED_{70} i ED_{90} vrijednosti kao pokazatelji količine simuliranih rezidua mezotriona koje uzrokuju 50, 70 i 90 % redukcije intenziteta fluorescencije klorofila kod graška.



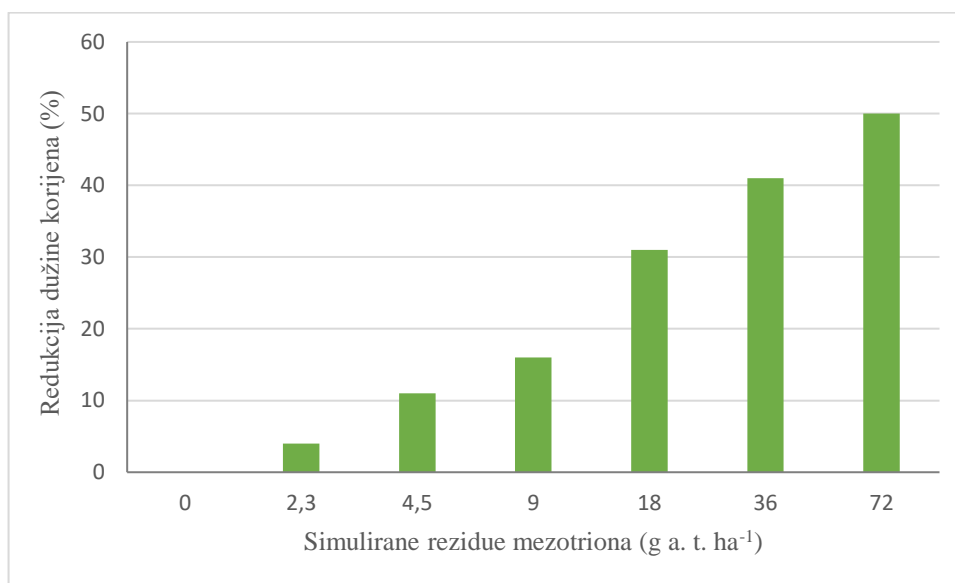
Grafikon 3. Krivulja osjetljivosti za redukciju intenziteta fluorescencije klorofila kod graška ovisno o količini primijenjenih simuliranih rezidua mezotriona

Iz vrijednosti prikazanih u grafikonu 3 vidljivo je da 50 % redukcije intenziteta fluorescencije klorofila uzrokuje količina simuliranih rezidua od $4,4 \text{ g a. t. ha}^{-1}$ koja odgovara svega 1/32 preporučene doze mezotriona, dok je za redukciju od 70 % potrebna količina od $7,1 \text{ g a. t. ha}^{-1}$ što odgovara 1/20

preporučene doze. Za redukciju od 90 % utvrđena je količina simuliranih rezidua od 15,01 g a. t. ha⁻¹ koja približno odgovara 1/10 preporučene doze mezotriona. Pintar i sur. (2020) navode da 50 % redukcije ukupnog sadržaja karotenoida u šećernoj repi uzrokuje količina simuliranih rezidua mezotriona od 4,7 g a. t. ha⁻¹ na hipoglej mineralnom tlu odnosno od 2,1 g a. t. ha⁻¹ na livadsko fluvijalnom tlu. S obzirom da je ovo istraživanje provedeno na tlu koje je temeljem svojih značajki klasificirano kao livadsko fluvijalno tlo, može se utvrditi da je s obzirom na manju količinu simuliranih rezidua mezotriona koja uzrokuje 50 % redukcije intenziteta fluorescencije klorofila šećerna repa osjetljivija kultura od graška.

5.3. Redukcija dužine korijena graška

Prilikom posljednjeg (35 DNS) vizualnog ocjenjivanja utvrđena je dužina korijena graška, a rezultati su izraženi kroz redukciju dužine korijena biljaka na tretmanima u odnosu na dužinu korijena biljaka na kontroli i prikazani u grafikonu 4.



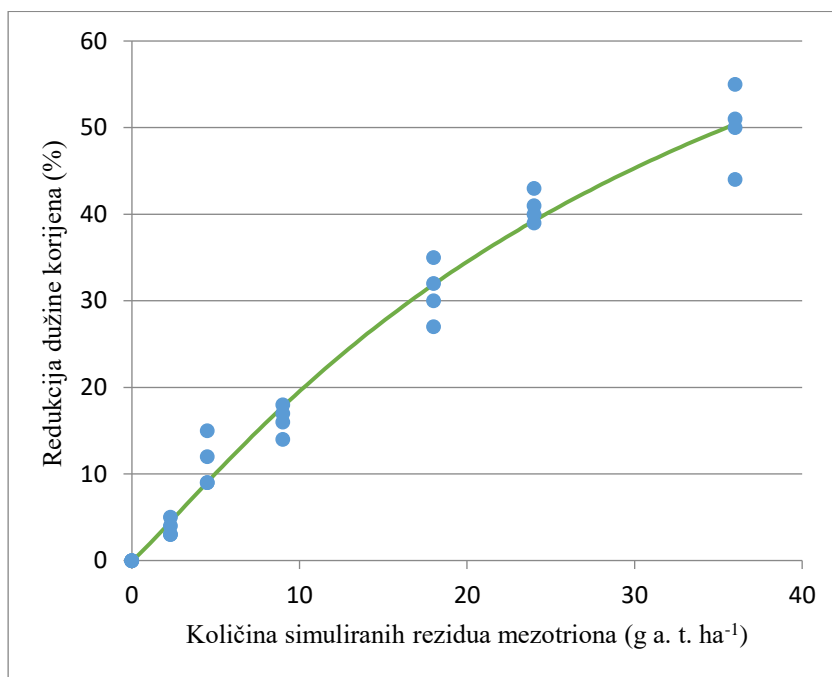
$LSD_{0,05} (T \times VO) = 3,8$ za usporedbu srednjih vrijednosti između tretmana i dužine korijena graška

Grafikon 4. Utjecaj simuliranih rezidua mezotriona na redukciju dužine korijena graška

Iz rezultata prikazanih u grafikonu 4. vidljivo je da je na svim tretmanima, u usporedbi s kontrolom, utvrđena značajna redukcija dužine korijena graška. Značajna razlika u redukciji korijena graška utvrđena je i između svih tretmana. Porastom količine simuliranih rezidua postotak redukcije značajno se povećavao. Tako je najmanja (4 %) redukcija utvrđena kod količine simuliranih rezidua od 2,3 g a. t. ha⁻¹, dok je najveća (50 %) redukcija dužine korijena graška utvrđena kod primjene 72 g a. t. ha⁻¹.

Na osnovi dobivenih podataka iz grafikona 4 izvedena je krivulja osjetljivosti (grafikon 5) te su

izračunate efektivne doze (ED_{50} , ED_{70} i ED_{90}) s ciljem utvrđivanja količine simuliranih rezidua mezotriona odgovornih za 50, 70 i 90 % redukcije dužine korijena graška.



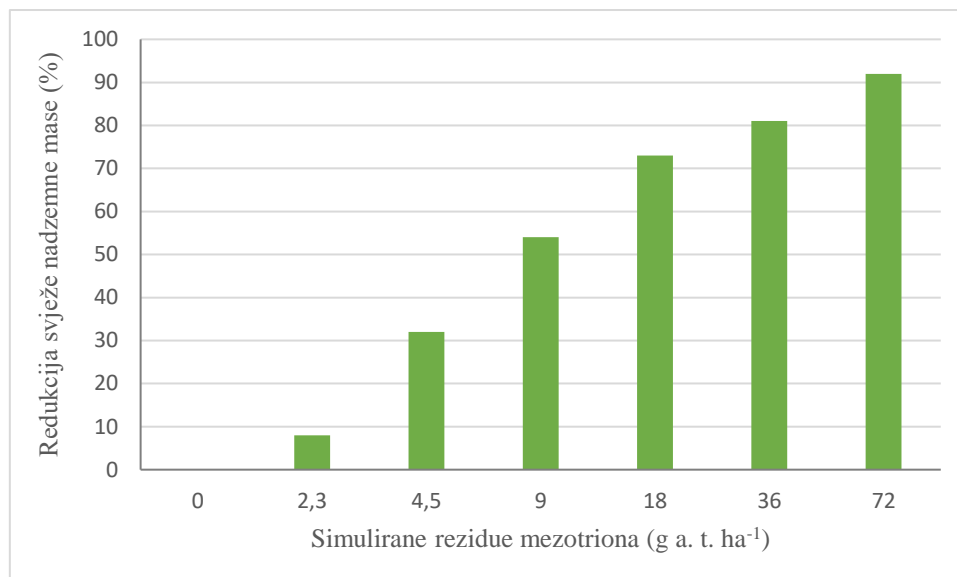
Grafikon 5. Krivulja osjetljivosti za redukciju dužine korijena graška ovisno o količini primijenjenih simuliranih rezidua mezotriona

Prema rezultatima prikazanim u krivulji, vidljivo je da količina simuliranih doza mezotriona koja uzrokuje 50 % redukcije dužine korijena graška iznosi 35,5 g a. t. ha⁻¹. Navedena količina odgovara 1/4 preporučene doze mezotriona. Odgovornom za 70 % redukcije dužine korijena graška utvrđena je količina simuliranih rezidua od 75,75 g a. t. ha⁻¹ koja približno odgovara 1/2 preporučene doze mezotriona. Količina simuliranih rezidua koja bi uzrokovala 90 % redukcije dužine korijena graška iznosi 253,48 g a. t. ha⁻¹ što odgovara gotovo 2X većoj dozi mezotriona od preporučene.

U istraživanju Sun i sur. (2019) 14 dana nakon aplikacije bensulfuron-metila, u usporedbi s kontrolom, nije bilo značajnih razlika u dužini korijena krastavca kod koncentracija rezidua od 6,25, 12,5 i 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Pri koncentracijama bensulfuron-metila od 50 do 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ redukcija je iznosila od 35 do 48 %. Mjerenjem dužine izdanaka utvrđena je nešto manja redukcija, a kretala se u rasponu od 18,84 do 45,35 % pri simuliranim koncentracijama bensulfuron-metila od 12,5 do 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

5.4. Redukcija svježe nadzemne mase graška

Rezultati svježe nadzemne mase graška prikazani su kroz redukciju svježe nadzemne mase graška na tretmanima u odnosu na svježu nadzemnu masu graška na kontroli (grafikon 6).

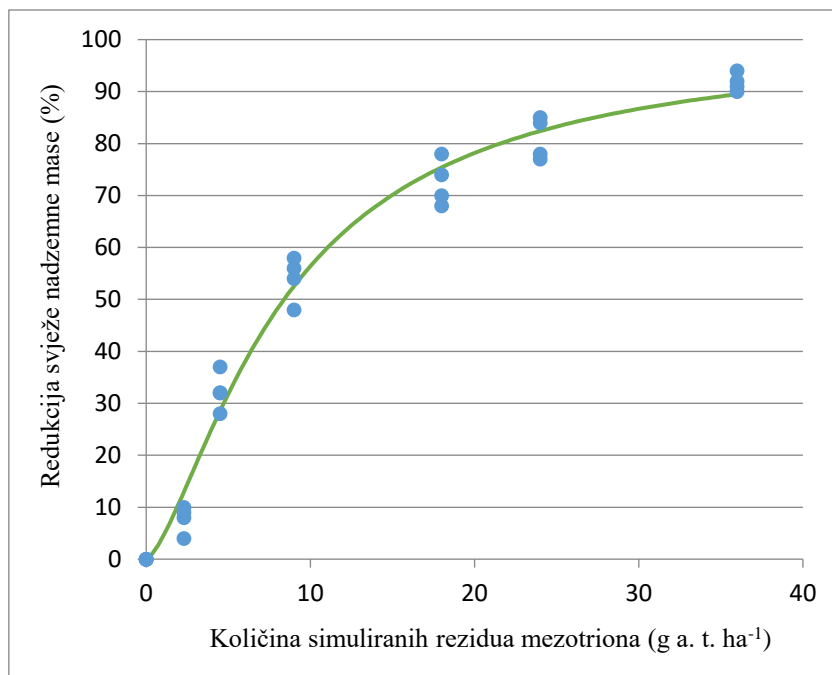


LSD_{0,05} = 4,7 za usporedbu utjecaja tretmana na redukciju svježe nadzemne mase graška

Grafikon 6. Utjecaj simuliranih rezidua mezo-triona na redukciju svježe nadzemne mase graška

Na svim tretmanima utvrđena je statistički značajna redukcija svježe nadzemne mase graška u odnosu na kontrolu. Osim toga, statistički značajna razlika u redukciji svježe nadzemne mase utvrđena je između svih tretmana. Najmanja (8 %) redukcija svježe nadzemne mase utvrđena je kod najmanje (2,3 g a. t. ha⁻¹) količine simuliranih rezidua mezo-triona. Primjenom simuliranih rezidua u količini od 72 g a. t. ha⁻¹ utvrđena je najveća (92 %) redukcija svježe nadzemne mase. Slične rezultate redukcije svježe nadzemne mase graška navode Riddle i sur. (2013). Prema rezultatima spomenutog istraživanja redukcija svježe nadzemne mase graška od 16 % utvrđena je kod količine simuliranih rezidua mezo-triona u od 28 g a. t. ha⁻¹ odnosno 51 % kod količine od 56 g a. t. ha⁻¹.

Na osnovi redukcije svježe nadzemne mase graška (grafikon 6) izvedena je krivulja osjetljivosti (grafikon 7) te su izračunate ED₅₀, ED₇₀ i ED₉₀ vrijednosti kao pokazatelji količine simuliranih rezidua mezo-triona koje uzrokuju 50, 70 i 90 % redukcije svježe nadzemne mase graška.



Grafikon 7. Krivulja osjetljivosti za redukciju svježe nadzemne mase graška ovisno o količini primijenjenih simuliranih rezidua mezotriona

Kao što je vidljivo iz grafikona redukciju svježe mase graška od 50 % uzrokuje količina simuliranih rezidua od 8,4 g a. t. ha⁻¹ koja odgovara 1/16 preporučene doze mezotriona. Redukcija od 70 % utvrđena je kod količine simuliranih rezidua od 15 g a. t. ha⁻¹ koja odgovara 1/10 preporučene doze. Redukciju svježe nadzemne mase od 90 % uzrokuje količina simuliranih rezidua od 37,4 g a. t. ha⁻¹, a koja odgovara približno 1/4 preporučene doze. Prema rezultatima istraživanja Pintar i sur. (2020) količina simuliranih rezidua odgovorna za 50 % redukcije svježe nadzemne mase šećerne repe iznosila je 4,4 g a. t. ha⁻¹ (1/33 R) na livadsko fluvijalnom tlu odnosno 5,9 g a. t. ha⁻¹ (1/24 R) na hipoglej mineralnom tlu. Na osnovi navedenih rezultata vidljivo je da je grašak, u odnosu na šećernu repu, manje osjetljiva kultura na rezidue mezotriona. U istraživanju Riddle i sur. (2013) šećerna repa se također pokazala osjetljivijom kulturom od graška. Redukcija svježe mase graška kretala se od 16 do 51 % pri količinama simuliranih rezidua mezotriona od 28 do 56 g a. t. ha⁻¹, dok je kod šećerne repe 100 %-tna redukcija svježe mase utvrđena pri količini simuliranih rezidua od 28 g a. t. ha⁻¹.

Temeljem izračunatih ED₅₀, ED₇₀ i ED₉₀ vrijednosti redukcije intenziteta fluorescencije klorofila, dužine korijena i svježe nadzemne mase graška utvrđeno je da je intenzitet fluorescencije klorofila, u odnosu na dužinu korijena i svježnu nadzemnu masu, pouzdaniji parametar osjetljivosti graška na simulirane rezidue mezotriona. Ukoliko usporedimo samo ED₅₀ vrijednosti vidljivo je da znatno manja količina simuliranih rezidua uzrokuje 50 % (4,4 g a. t. ha⁻¹) redukcije intenziteta fluorescencije klorofila u odnosu na količinu simuliranih rezidua koje uzrokuju 50 % (8,4 g a. t. ha⁻¹) redukcije svježe nadzemne mase i 50 % (35,5 g a. t. ha⁻¹) redukcije dužine korijena.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Potvrđena je hipoteza o različitoj osjetljivosti graška na primijenjene količine simuliranih rezidua mezotriona. Povećanjem količine simuliranih rezidua mezotriona oštećenja na grašku su se povećavala.
- Najveća vizualna oštećenja na svim istraživanim tretmanima utvrđena su 35 dana nakon sjetve graška, a kretala su se od 63 % (2,3 g a. t. ha⁻¹) do 97 % (72 g a. t. ha⁻¹).
- Utvrđene količine simuliranih rezidua mezotriona odgovorne za 50, 70 i 90 % redukcije intenziteta fluorescencije klorofila odgovaraju 1/32 (4,4 g a. t. ha⁻¹), 1/20 (7,1 g a. t. ha⁻¹) i 1/10 (15,01 g a. t. ha⁻¹) preporučene doze mezotriona.
- Količine simuliranih rezidua mezotriona koje uzrokuju 50, 70 i 90 % redukcije dužine korijena graška iznose 35,5 g a. t. ha⁻¹ (1/4 R), 75,75 g a. t. ha⁻¹ (1/2 R) i 253,48 g a. t. ha⁻¹ (2x R).
- Količine simuliranih rezidua mezotriona odgovorne za 50, 70 i 90 % redukcije svježe nadzemne mase graška iznose 8,4 g a. t. ha⁻¹ (1/16 R), 15 g a. t. ha⁻¹ (1/10 R) i 37,4 g a. t. ha⁻¹ (1/4 R).
- Intenzitet fluorescencije klorofila pouzdaniji je parametar za procjenu osjetljivosti graška na simulirane rezidue mezotriona od redukcije dužine korijena i svježe nadzemne mase. Količine simuliranih rezidua mezotriona koje uzrokuju 50, 70 i 90 %-tnu redukciju intenziteta fluorescencije klorofila značajno su manje od količina koje uzrokuju 50, 70 i 90 %-tnu redukciju dužine korijena i svježe nadzemne mase graška.

7. ZAHVALE

Želim se od srca zahvaliti svojoj mentorici, dr. sc. Ani Pintar, koja je bila uz mene u svakom trenutku izrade ovog rada. Neizmjereno hvala na ukazanom povjerenju i prilici, i na svom nesebično izdvojenom vremenu, prenesenom znanju i velikom strpljenju.

Veliko hvala Josipu Lakiću, mag. ing. agr., na pomoći i smijehu prilikom eksperimentalnog dijela istraživanja. Hvala i doc. dr. sc. Borisu Lazareviću, na ustupljenom uređaju za provedbu dijela ovog istraživanja.

Hvala mojim roditeljima i sestrama na strpljenju i razumijevanju, i hvala mom djedu i baki što su, kao i uvijek, moja najveća podrška.

Na kraju, hvala izv. prof. dr. sc. Klari Barić što me usmjerila na ovaj put.

8. LITERATURA

1. Abendroth, J. A., Martin, A. R., Roeth, F. W. (2006). Plant response to combinations of mesotrione and photosystem II inhibitors. *Weed Technology*, 20(1): 267-274.
2. Armel G. R., Hall G. J., Wilson H. P., Cullen N. (2005). Mesotrione plus atrazine mixtures for control of Canada thistle (*Cirsium arvense*). *Weed Science*, 53: 202–211.
3. Bailey, G. W., & White, J. L. (1964). Soil-Pesticide Relationships, Adsorption and Desorption of Organic Pesticides by Soil Colloids, with Implications Concerning Pesticide Bioactivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12(4): 324–332.
4. Barchanska, H., Sajdak, M., Szczypka, K., Swientek, A., Tworek, M., Kurek, M. (2017). Atrazine, triketone herbicides, and their degradation products in sediment, soil and surface water samples in Poland. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(1): 644-658.
5. Barić K. i Ostojić Z. (2020). Herbicidi. U: Pregled sredstava za zaštitu bilja u Hrvatskoj za 2020. godinu. *Glasilo biljne zaštite*, 20(1-2): 219-291.
6. Barnes C. J., Lavy T. L. (1991). Injury and yield response of selected crops to imazaquin and noflurazon residues. *Weed Technology*, 5: 598-606.
7. Barriuso, E., Calvet, R. (1992). Soil type and herbicides adsorption. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 46(1-3): 117-128.
8. Beaudegnies, R., Edmunds, A. J. F., Fraser, T. E. M., Hall, R. G., Hawkes, T. R., Mitchell, G., Schaezter, J., Wendeborn, S., Wibley, J. (2009). Herbicidal 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors - A review of the triketone chemistry story from a Syngenta perspective. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17: 4134-4152.
9. Blacklow, W. M., Pheloung, P. C. (1991). Sulfonylurea herbicides applied to acidic sandy soils: a bioassay for residues and factors affecting recoveries. *Australian Journal of Agricultural Research*, 42, 1205-1216.
10. Burnside, O. C., Fenster, C. R., Wicks, G. A., Drew, J. V. (1969). Effect of soil and climate on herbicide dissipation. *Weed Science*, 17: 241-&.
11. Carles, L., Joly, M., Joly P. (2017). Mesotrione herbicide: efficiency, effects and fate in the environment after 15 years of agricultural use. *CLEAN – Soil, Air, Water* 45(9).
12. Chaabane, H., Vulliet, E., Calvayrac, C., Coste, C. M., Cooper, J. F. (2008). Behaviour of sulcotrione and mesotrione in two soils. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(1): 86-93.
13. Crouch, N. P., Adlington, R. M., Baldwin, J. E., Lee, M. H., MacKinnon, C. H. (1997). A mechanistic rationalization for the substrate specificity of recombinant mammalian 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD). *Tetrahedron*, 53: 6993-7010.

14. de Souza, A. P., Ferreira, F. A., da Silva, A. A., Ruiz, H. A., Prates, H. T. (2000). Glyphosate and imazapyr leaching in soils with different textures and chemical composition. I-Bioassay method. *Planta Daninha*, 18(1): 5-15.
15. Devlin, D. L., Peterson, D. A., Regehr, D. L. (2002). Residual Herbicides, degradation and Recropping Intervals. Kansas State University Publication C-707.
16. Durand, S., Legeret, B., Martin, A. S., Sancelme, M., Delort, A. M., Besse-Hoggan, P., Combourieu, B. (2006). Biotransformation of the triketone herbicide Mesotrione by a *Bacillus* strain. Metabolite profiling using liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 20: 2603-2613.
17. Dyson, J. S., Beulke, S., Brown, C. D., Lane, M. C. G. (2002). Adsorption and degradation of the weak acid mesotrione in soil and environmental fate implications. *Journal of Environmental Quality*, 31(2): 613-618.
18. Felix J., Doohan D. J., Bruins D. (2007). Differential vegetable crop responses to mesotrione soil residues a year after application. *Crop Protection*, 26: 1395-1403.
19. Guimarães, G. L. (1987). Impactos ecológicos do uso de herbicidas ao meio ambiente. *Série técnica IPEF*, 4(2), 159-180.
20. Günther, P., Pestemer, W., Rahman, A., Nordmeyer, H. (1993). A bioassay technique to study the leaching behaviour of sulfonylurea herbicides in different soils. *Weed Research*, 33: 177-185.
21. Hance, R.J. (1987). Some continuing uncertainty in knowledge of herbicide behavior in soil. *Annals of Applied Biology*. 110: 195-202.
22. Harris, C. I., Warren, G. F. (1964). Adsorption and desorption of herbicides by soil. *Weeds*, 12(2): 120-126.
23. Harvey, R. G. (1987). Herbicide dissipation from soils with different use patterns. *Weed Sci.* 35: 583-589
24. Helling C. S. (2005). The science of soil residual herbicides. U: Soil Residual Herbicides: Science and Management, (ur. Van Acker, R. C.), Topics in Canadian Weed Science, Canadian Weed Science Society, 3: 3-22.
25. Horowitz, M. (1976). Application of bioassay techniques to herbicide investigations. *Weed Research*. 16: 209-215.
26. Kerle, A. E., Jenkins, J. J., Vogue, A. P. (2007). Understanding pesticide persistence and mobility for groundwater and surface water protection. Oregon State University, Extension Service, EM 8561-E.
27. Koschmieder, J., Fehling-Kaschek, M., Schaub, P., Ghisla, S., Brausemann, A., Timmer, J., Beyer, P. (2017). Plant-type phytoene desaturase: Functional evaluation of structural implications. *PloS one*, 12(11).

28. Maurice, D. C. (2005). Managing soil residual herbicide use in Western Canada. Soil residual herbicides: science and management. *Topics in Canadian Weed Science*, 3: 101-113.
29. Maxwell, K., Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of experimental botany*, 51(345): 659-668.
30. Mendes, K. F., Martins, B. A. B., dos Reis, M. R., Pimpinato, R. F., Tornisielo, V. L. (2017). Quantification of the fate of mesotrione applied alone or in a herbicide mixture in two Brazilian arable soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(9): 8425-8435.
31. Mitrić, S., Marković, M., Babić, M., Šipka, M., Pešević, D., Dragičević, D. (2016). Physical-chemical characteristics of herbicides used for maize production in BiH as factors of potential herbicide leaching in groundwater. *Radovi Šumarskog Fakulteta Univerziteta u Sarajevu. Posebno izdanje*, 21(1): 297-305.
32. Murchie, E. H., Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of experimental botany*, 64(13), 3983-3998.
33. Öerke, E. C. (2005). Crop losses to pest. *Journal of Agricultural Science*, 144: 31-43.
34. Ostojić, Z. (1989). Herbicidi i tlo. U: *Studija o jedinstvenim kriterijima zagađivača voda, vazduha i tla na području SAP Vojvodine i potrebne hitne mere zaštite na mestima sa najvažnijim zagađivačima*, 319-332.
35. Ostojić, Z. (2004). Biotest (bio assay) za dokazivanje rezidualnog učinka perzistentnih herbicida na kulture u plodoredu. *Glasilo biljne zaštite* 1: 13-19.
36. O'Sullivan, J. (2005). Development of a grower-friendly bioassay to determine the potential effect of imazethapyr residues in soil on vegetable crops. *Soil Residual Herbicides*, 81-88.
37. Pimentel D. (1995). Amounts of pesticides reaching the target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural Environmental Ethics* 8: 17–29.
38. Pintar A., Ostojić Z., Barić K. (2017). Biotest metode za utvrđivanje rezidua herbicida u tlu. *Glasilo biljne zaštite* 17(4): 369-377.
39. Pintar, A., Stipičević, S., Lakić, J., Barić, K. (2020). Phytotoxicity of Mesotrione Residues on Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) in Agricultural Soils Differing in Adsorption Affinity. *Sugar Tech*, 22(1): 137-142.
40. Rabaey T. L., Harvey R. G. (1997). Sweet corn (*zea mays*) hybrids respond differently to simulated imazethapyr carryover. *Weed Technology* 11: 92-97.
41. Radivojević, L., Umiljendić, J. G., Marisavljević, D., Anđelković, A., Pavlović, D. (2014). Primena mezotriona u kombinaciji sa terbutilazinom, nikosulfuronom i S-metolahlorom u kukuruzu. *Zaštita bilja plant protection*, 155.
42. Riddle R. N., O'Sullivan J., Swanton C. J., Van Acker R. C. (2013). Crop Response to Carryover of Mesotrione Residues in the Field. *Weed Technology* 27: 92-100.
43. Riddle, R. N. (2012). Field and greenhouse bioassays to determine rotational crop response to mesotrione residues. Doctoral dissertation, University of Guelph.

44. Robinson D. E. (2008). Atrazine accentuates carryover injury from mesotrione in vegetable crops. *Weed Technology* 22: 641-645.
45. Romdhane, S., Devers-Lamrani, M., Beguet, J., Bertrand, C., Calvayrac, C., Salvia, M. V., Jrad, A. B., Dayan, F. E., Spor, A., Barthelmebs, L., Martin-Laurent, F. (2019). Assessment of the ecotoxicological impact of natural and synthetic β -triketone herbicides on the diversity and activity of the soil bacterial community using omic approaches. *Science of The Total Environment*, 651: 241-249.
46. Rouchaud, J., Neus, O., Eelen, H., Bulcke, R. (2001). Mobility and adsorption of the triketone herbicide mesotrione in the soil of corn crops. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 79(3-4): 211-222.
47. Schmidt, R. R. (1993). *Development of Herbicides - Role of Bioassays*. U: *Herbicide Bioassays*, Streibig, J.C., Kudsk. P. Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 7-28.
48. Sekutowski, T. (2011). Application of bioassays in studies on phytotoxic herbicide residues in the soil environment. *Herbicides and Environment*, Kortekamp A.(Ed.), 253-272.
49. Soltani N., Sikkema P. H., Robinson D. E. (2007). Response of four market classes of dry bean to mesotrione soil residues. *Crop Protection* 26(11): 1655-1659.
50. Sousa, C. P., Pinto, J. J. O., Martinazzo, E. G., Perboni, A. T., Farias, M. E., Bacarin, M. A. (2014). Chlorophyll a fluorescence in rice plants exposed of herbicides of group imidazolinone. *Planta Daninha*, 32(1): 141-150.
51. Stek, H. J., D. C. Burkhart, S. D. Strachan, C. J. Peters, M. Ruggiero, R. W. Warner. (1989). Use of bioassays to characterize the risk of injury to follow crops by sulfonylurea herbicides. *Proc. Brighton Crop Protection Conf. (Weeds)*. 245 –250.
52. Su, W., Hao, H., Wu, R., Xu, H., Xue, F., & Lu, C. (2017). Degradation of mesotrione affected by environmental conditions. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 98(2): 212-217.
53. Torma M., Radvany B., Hodi L. (2004). Effect of mesotrione residues on following crops. *Journal of Plant Diseases and Protection* 19: 801–805.
54. Truelove, B., Davis, D. E., Jones, L. R. (1974). A new method for detecting photosynthetic inhibitors. *Weed Science*, 22: 15-20.
55. Upchurch, R. P. (1966). Behavior of herbicides in soil. *Residue Reviews / Rückstands-Berichte*, 46–85. Vol. 3, Dekker, New York, 117–189.
56. Wichert R.A., Townson J.K., Bartlett D,W, Foxon, G.A. (1999). Technical review of mesotrione, a new maize herbicide. U: 1999 Brighton Crop Protection Conference: Weeds.Proceedings of an International Conference. 105-110.
57. Witt, W., Evetts, L., Davidson, J. M., Santelmann, P. W. (1970). Influence of herbicide application method on bioassay sensitivity. *Proceedings of the Southern Weed Science Society*, 23: 338-342.

58. Wu, C., Zhang, S., Nie, G., Zhang, Z., Wang, J. (2011). Adsorption and desorption of herbicide monosulfuron-ester in Chinese soils. *Journal of environmental sciences*, 23(9): 1524-1532.
59. Xia, X. J., Huang, Y. Y., Wang, L., Huang, L. F., Yu, Y. L., Zhou, Y. H., Yu, J. Q. (2006). Pesticides-induced depression of photosynthesis was alleviated by 24-epibrassinolide pretreatment in *Cucumis sativus* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86(1): 42-48.

8. SAŽETAK

Filipa Burul

Simulirani biotest za utvrđivanje osjetljivosti graška (*Pisum sativum* L.) na rezidue mezotriona

Grašak (*Pisum sativum* L.) je, prema Hrvatskim službenim podacima ograničenja plodoreda nakon primjene mezotriona, jedna od osjetljivih kultura na rezidue mezotriona u tlu. Stoga je glavni cilj ovog istraživanja bio primjenom biotesta utvrditi razinu fitotoksičnog djelovanja simuliranih rezidua mezotriona na grašak. Uzorci tla s posijanim sjemenkama graška tretirani su reduciranim dozama od 2,3; 4,5; 9,0; 18; 24; 36 i 72 g a. t. ha⁻¹, kojima su simulirane rezidue mezotriona koje se, s obzirom na njegov poluvijek raspada u poljskim uvjetima, mogu očekivati u tlu tijekom vremena nakon njegove primjene. Sve istraživane doze mezotriona, uključujući i kontrolnu varijantu (0 g a. t. ha⁻¹), postavljene se u četiri ponavljanja, a dizajn pokusa bio je slučajni blokni raspored. Osjetljivost graška utvrđivana je 14, 28 i 35 dana nakon sjetve (DNS) graška vizualnom ocjenom fitotoksičnog učinka prema skali od 0 do 100 %, mjerenjem intenziteta fluorescencije klorofila te utvrđivanjem dužine korijena i svježe nadzemne mase 35 DNS graška. Na svim tretmanima najveća vizualna oštećenja utvrđena su 35 DNS graška, a kretala su se od 63 % (2,3 g a. t. ha⁻¹) do 97 % (72 g a. t. ha⁻¹). Temeljem izračunatih ED₅₀, ED₇₀ i ED₉₀ vrijednosti redukcije intenziteta fluorescencije klorofila, dužine korijena i svježe nadzemne mase graška utvrđeno je da znatno manja količina simuliranih rezidua uzrokuje 50 % (4,4 g a. t. ha⁻¹), 70 % (7,1 g a. t. ha⁻¹) i 90 % (15,01 g a. t. ha⁻¹) redukcije intenziteta fluorescencije klorofila u odnosu na količinu simuliranih rezidua koje uzrokuju 50 % (8,4 g a. t. ha⁻¹), 70 % (15,0 g a. t. ha⁻¹) i 90 % (37,4 g a. t. ha⁻¹) redukcije svježe nadzemne mase i 50 % (35,5 g a. t. ha⁻¹), 70 % (75,75 g a. t. ha⁻¹) i 90 % (253,48 g a. t. ha⁻¹) redukcije dužine korijena. Provedenim istraživanjem je utvrđeno da količina simuliranih rezidua mezotriona koja odgovara svega 1/32 preporučene doze može uzrokovati značajna oštećenja na grašku koja se najprije manifestiraju inhibicijom fotosintetskih procesa, a koji su utvrđeni kao najbolji pokazatelji fitotoksičnog djelovanja mezotriona.

Ključne riječi: grašak; mezotrion; biotest; simulirane rezidue; fitotoksičnost

9. SUMMARY

Filipa Burul

Simulated bioassay for the determination of sensitivity of pea (*Pisum sativum* L.) to mesotrione residues

According to Croatian official crop rotation restrictions, pea (*Pisum sativum* L.) is one of the most sensitive crops to mesotrione residues in soil. Thus, the main objective of this study was to determine the level of phytotoxic effect of simulated mesotrione residues on pea by using a bioassay. The soil samples with sown pea seeds were treated with reduced doses of 2.3; 4.5; 9.0; 18; 24; 36 and 72 g a.i. ha⁻¹ of mesotrione. The listed application rates represent the amounts of residue of mesotrione which can be expected in soil over its half-life time, under field conditions. The control (0 g a.i. ha⁻¹ mesotrione) was also included in the bioassay. The experimental design was a randomized complete blocks arrangement in four replications. The sensitivity of pea was determined 14, 28 and 35 days after sowing (DAS) by visual phytotoxicity assessment, using a scale of 0% to 100%, through the measuring of the chlorophyll fluorescence intensity, root length and by determination of the fresh weight content for 35 DAS. The greatest damage was visually observed at 35 DAS, in the range from 63% (2.3 g a.i. ha⁻¹) to 97% (72 g a.i. ha⁻¹). Based on the calculation of the effective dose (ED₅₀; ED₇₀ and ED₉₀) which is responsible for the 50%; 70% and 90% reduction of the chlorophyll fluorescence intensity, root length and fresh weight content, it was determined that significantly smaller amount of simulated residues causes reduction of 50% (4.4 g a.i. ha⁻¹), 70% (7.1 g a.i. ha⁻¹) and 90% (15.01 g a.i. ha⁻¹) chlorophyll fluorescence intensity in regards to the amount that causes 50% (8.4 g a.i. ha⁻¹), 70% (15.0 g a.i. ha⁻¹) and 90% (37.4 g a.i. ha⁻¹) reduction of fresh weight content and also 50% (35.5 g a.i. ha⁻¹), 70% (75.75 g a.i. ha⁻¹) and 90% (253.48 g a.i. ha⁻¹) root length reduction. Results from this research show that mesotrione residue, in amounts as small as 1/32 of the recommended application rate can cause significant phytotoxic damage on pea. Phytotoxic damage is primarily manifested through the inhibition of photosynthetic processes, which have been proven to be the best indicator of pea sensitivity to mesotrione residues.

Keywords: pea; mesotrione; bioassay; simulated residues; phytotoxicity

ŽIVOTOPIS AUTORA

Filipa Burul rođena je 22. listopada 1996. godine u Splitu. Osnovnoškolsko obrazovanje je pohađala u Osnovnoj školi kneza Trpimira u Kaštel Gomilici istovremeno sa Osnovnom glazbenom školom Josipa Hatzea u Kaštel Kambelovcu; smjer violina. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja u Zdravstvenoj školi u Splitu sudjelovala je na projektu „E-medica“ i 6. smotri „Dani E-medica“ u Puli. Maturirala je 2014. godine i stekla zvanje zdravstveno-laboratorijske tehničarke. Iste godine upisuje preddiplomski studij Zaštite bilja na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U 2018. godini prisustvovala je 18. međunarodnom znanstvenom simpoziju o korovima (*New approaches for smarter weed management*) u organizaciji Europskog društva za proučavanje korova (*European Weed Research Society*). Iste godine završava preddiplomski studij i upisuje diplomski studij Fitomedicine na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom preddiplomskog i diplomskog studija član je izvannastavne aktivnosti „Čudesni svijet korova“ u okviru koje sudjeluje na brojnim aktivnostima i promotivnim danima Agronomskog fakulteta. Sudjeluje i na projektima „PANDA 3“ 2019. i „PANDA 4“ 2020. godine u istraživačkom radu sa osnovnoškolskom djecom gdje je sudjelovala u provođenju istraživanja „Sjemenke korova spavaju – kako ih probuditi?“ i "Upoznaj i uzgoji svoju korovnu vrstu". Također je sudjelovala i na Erasmus+ projektu „Migration matters“ za učenike strukovnih škola u suradnji s Gospodarskom školom Čakovec. Prisustvovala je 63. i 64. Seminaru biljne zaštite u Opatiji i sudjelovala u poster-sekciji. U 2019. godini nagrađena je nagradom Hrvatskog društva biljne zaštite za uspjeh tijekom studiranja, a 2020. godine osvaja prvo mjesto na nagradnom natječaju „Student DIGI Award“ za najboljeg mladog inovatora, na koji se prijavila s idejom o digitalnom prepoznavanju korova (aplikacija „CroCot“). Demonstratorica je na modulu „Osnove herbologije“ za vrijeme ljetnog semestra akademske godine 2018./2019. i 2019./2020. Član je Hrvatskog društva biljne zaštite (HDBZ) i *European Weed Research Society*-a (EWRS).