

## PRZYMIOTNO KANADYJSKIE (*CONYZA CANADENSIS* L.) ODPORNE NA GLIFOSAT

KAZIMIERZ ADAMCZEWSKI, ROMAN KIERZEK, KINGA MATYSIAK

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy  
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań  
K.Adamczewski@iorpib.poznan.pl

### I. WSTĘP

Przymiotno kanadyjskie (*Conyza canadensis* L.) jest rośliną roczną, tworzy formy ozime i jare, czasem może być także dwuletnią. Jest to pospolity chwast występujący w całej Polsce – głównie: w ogrodach, sadach, na polach, często na ścierniskach, na ugorach, przydrożach, podwórzach, torach i nasypach kolejowych oraz w wielu innych miejscach. Przymiotno kanadyjskie lubi gleby lekkie, suche, najczęściej piaszczyste, unika gleb wapiennych. Owocem są niełupki opatrzone puchem umożliwiającym przenoszenie przez wiatr na bardzo dalekie odległości. Jak podaje Shields i wsp. (2006), pojedyncze nasiona mogą być przeniesione przez wiatr nawet na odległość 300 km. Niełupki kiełkują jesienią lub wiosną, rośliny wyrastają od 15 cm do 1 m wysokości.

Glifosat jest herbicydem nieselektywnym zwalczającym niemal wszystkie chwasty. Jest to jeden z najpowszechniej stosowanych preparatów w skali światowej. Wprowadzenie do uprawy roślin transgenicznych (GMO – Genetically Modified Organism) odpornych na glifosat zwielaokrotniło stosowanie tego herbicydu, szczególnie w Stanach Zjednoczonych. Pierwsza informacja dotycząca odporności *Lolium rydrigum* na glifosat pochodzi z Australii z roku 1999 (Colwill i wsp. 1999), natomiast pierwsze doniesienie dotyczące występowania w uprawie soi przymiotna kanadyjskiego odpornego na glifosat pochodzi z roku 2001, ze Stanów Zjednoczonych, ze Stanu Delaware (van Gessel 2001).

Mechanizm odporności dla większości chwastów odpornych na glifosat jest zróżnicowany. Istnieją dwa podstawowe mechanizmy odporności: odporność w miejscu działania (target site resistance), związana z mutacją genu kodującego biosyntezę syntazy EPSP oraz odporność nie mutacyjna (non target site resistance), związana najczęściej z metabolicznym rozkładem glifosatu (Nandula 2010). W ostatnich latach został odkryty nowy mechanizm odporności, który jest związany ze zmianą przemieszczania się substancji aktywnej w roślinie (Koger i Reddy 2005; Yuan i wsp. 2007, 2010; Kaundun i wsp. 2008). Aby nastąpiła śmierć rośliny glifosat musi przemieścić się do tkanek merystematycznych. W biotypach odpornych transport glifosatu odbywa się nie do tkanek merystematycznych, ale do końca blaszki liściowej. Roślina nie ginie, uszkodzeniu

ulega blaszka liściowa, zahamowany zostaje rozwój, a po pewnym czasie następuje wzrost nowych liści i dalszy rozwój rośliny.

W Polsce, do zwalczania chwastów w uprawach sadowniczych i na torach kolejowych, od wielu już lat, stosuje się glifosat. Dlatego należało się spodziewać, że w tych miejscach może wystąpić odporność na glifosat.

Celem badań było sprawdzenie, czy w Polsce na torach kolejowych występują chwasty odporne na glifosat.

## II. MATERIAŁ I METODY

### Zebranie prób

Do badań odporności na glifosat zebrano próby nasion 11 gatunków chwastów: *Anthemis arvensis*, *Anthemis tinctoria*, *Bromus sterilis*, *Conyza canadensis*, *Galium aparine*, *Matricaria inodora*, *Papaver rhoeas*, *Papaver dubium*, *Papaver argemone*, *Senecio vulgaris*, *Viola arvensis*, z torów kolejowych na trasie Poznań–Piła, na przedmieściach Poznania. Na terenie tym, pomimo stosowania do zwalczania roślinności przez ostatnie 12–15 lat glifosatu, występuje wiele gatunków roślin. Jako standard (biotyp wrażliwy) użyto tych samych gatunków chwastów zebranych z terenów nieużytkowanych rolniczo, na których nie stosowano glifosatu.

### Badania szklarniowe

W warunkach laboratoryjnych rośliny wymłócono i po oczyszczeniu nasiona umieszczono na 1 tydzień w lodówce w temperaturze około  $-5^{\circ}\text{C}$ , celem przerwania okresu spoczynku. Tak przygotowany materiał był przedmiotem badań szklarniowych. Wykonano 2 rodzaje doświadczeń. W pierwszym etapie zastosowano glifosat w jednej dawce, w ilości 540 g/ha (Roundup 360 SL 1,5 l/ha). Wyniki doświadczenia wykazały, że wszystkie gatunki, za wyjątkiem *C. canadensis*, zostały w 100% zniszczone, dlatego z *C. canadensis* wykonano drugie doświadczenie z 5 dawkami glifosatu: 90, 180, 270, 360 i 540 g/ha.

Doświadczenia szklarniowe wykonano w czterech powtórzeniach w plastikowych wazonach o pojemności 0,75 litra i średnicy 12 cm. Do doświadczeń użyto glebę ogrodniczą wymieszaną z piaskiem w stosunku 3:1. Do każdego wazonu wysiewano po około 25–35 niełupek, po wschodach rośliny przerywano, pozostawiając w wazonie po 13 roślin. Zabieg opryskiwania herbicydami wykonano opryskiwaczem szklarniowym na sprężone powietrze w fazie 4–5 liści. Ocenę działania herbicydu wykonano wizualnie po 3, 5 i 7 tygodniach od zastosowania oceniając procent zniszczenia w porównaniu do kontroli. W ostatniej ocenie, po 7 tygodniach od zabiegu, policzono rośliny i oznaczono świeżą masę. Uzyskane wyniki przedstawiono w procentach, przyjmując obiekt kontrolny jako 100. Wyniki z doświadczeń szklarniowych oceniono statystycznie, wykonując analizę wariancji. Dla każdego biotypu określono krzywą regresji, przy poziomie ufności 0,05%. Analizę statystyczną wykonano przy pomocy programu komputerowego Polo Plus (Robertson i wsp. 2002). Program ten automatycznie wykreśla krzywą oraz wykonuje obliczenia dawki efektywnej ( $ED_{50}$ ), powodującej 50% redukcji liczby roślin lub zielonej masy roślin. Na tej podstawie obliczono wskaźnik odporności.

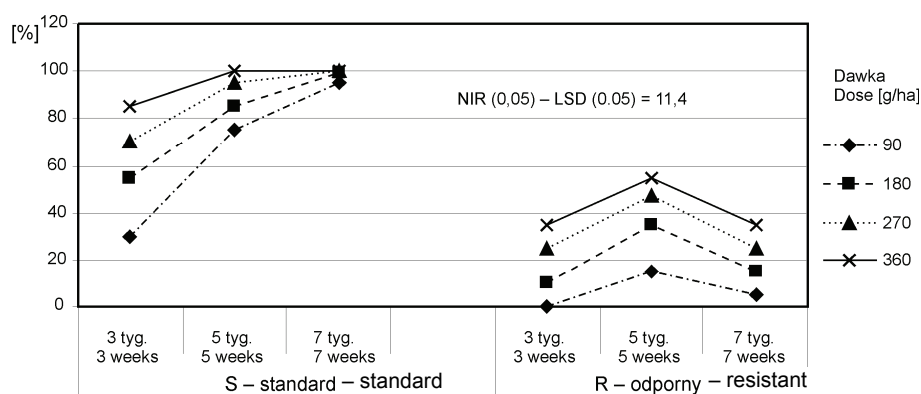
### Retencja

Pomiary retencji kropel cieczy roboczej zawierającej glifosat wykonano fazy 8–10 liści przymiotna kanadyjskiego wyhodowanego w warunkach szklarniowych. W celu oznaczenia ilości naniesionej cieczy na powierzchnię liści do cieczy roboczej dodano barwnik safraninę w dawce 0,3 g na 1000 ml cieczy. Jako standard zastosowano barwnik safraninę bez glifosatu. Doniczki z roślinami umieszczano w komorze kabiny opryskiwacza laboratoryjnego, a następnie wykonano zabieg opryskiwania z zachowaniem następujących parametrów roboczych: rozpylacz XR 11002, ciśnienie robocze – 0,2 MPa i dawka cieczy roboczej – 200 l/ha. Jeden obiekt doświadczalny stanowiły 3 doniczki każdego biotypu. Po zabiegu z każdej doniczki ścinano po 5 liści i umieszczano w specjalnych pojemnikach zawierających stałą ilość (10 ml) mieszaniny alkoholu metylowego i wody destylowanej w proporcji 2:1. Po spłukaniu barwnika z liści, zabarwioną ciecz przechowywano w zamkniętych pojemnikach w lodówce. Liście wyłożono na bibułę filtracyjną i poddano sprasowaniu na prasie hydraulicznej. Retencję cieczy na liściach obliczano na spektrofotometrze, jako wartość absorpcji barwnika przy określonej długości fali ( $\lambda = 530$  nm). Do oznaczenia powierzchni opryskiwanych liści roślin testowych (z których zmywano barwnik) wykorzystano komputerowy system analizy obrazu z wykorzystaniem programu MultiScanBase v. 8.08 oraz kamery video Panasonic WV-CL 702. Za pomocą kamery video obraz z powierzchnią liści przekazano na monitor komputera i dalej przez odpowiednie filtrowanie obrazu uzyskiwano wielkość powierzchni liści w  $\text{cm}^2$ . Doświadczenie wykonano na 15 liściach dla każdej kombinacji, w układzie całkowicie losowym. Wyniki pomiarów przedstawiono jako ilość zatrzymanej cieczy użytkowej na jednostce powierzchni liścia ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ).

### III. WYNIKI I DISKUSJA

W pierwszym doświadczeniu zastosowano jedną dawkę glifosatu (Roundup 360 SL 1,5 l/ha) na 11 gatunków chwastów. Po 3 tygodniach od zabiegu badane rośliny uległy zniszczeniu. W przypadku przymiotna kanadyjskiego uszkodzone zostały głównie liście, ale stożek wzrostu nie został zniszczony, dlatego nastąpił wzrost nowych liści i zanotowano stopniową regenerację roślin. Dla stwierdzenia czy mamy do czynienia z odpornością, wykonano ponowne doświadczenie, w którym zastosowano kilka dawek glifosatu. W doświadczeniu tym w okresie 3, 5 i 7 tygodni po zabiegu wykonano ocenę działania glifosatu na rośliny przymiotna kanadyjskiego, uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 1. W tym czasie wykonano także fotografię roślin (rys. 3). Podczas pierwszej oceny, 3 tygodnie po zabiegu, zanotowano wyraźne różnice w efektach działania glifosatu na oba biotypy przymiotna kanadyjskiego. Biotyp wrażliwy (S – standard) był w bardzo dużym stopniu zwalczony, szczególnie po zastosowaniu najwyższej dawki preparatu. Natomiast działanie glifosatu na biotyp odporny było znacznie mniejsze. Ocena wykonana po 5 tygodniach od zabiegu wykazała, że różnice w zniszczeniu roślin obu biotypów przez glifosat były mniejsze, co szczególnie było widoczne przy najwyższych dawkach glifosatu. Jednak rośliny biotypu wrażliwego (S) uległy całkowitemu zniszczeniu. Natomiast charakter zniszczenia roślin biotypu odpornego (R) był inny. Uszkodzeniu uległy tylko liście. Natomiast nie został uszkodzony stożek wzrostu, co skutkowało tym, że nastąpił odrost nowych liści i ponowny wzrost roślin. Ocena

i obserwacja wykonana 7 tygodni po zabiegu wykazała, że wygląd roślin oraz procent uszkodzenia przymiotna kanadyjskiego biotypu odpornego był podobny do tego po 3 tygodniach od zabiegu. Dane te wskazują na mechanizm odporności wynikający ze zmian we wnikaniu i przemieszczaniu się glifosatu w roślinie. Aby nastąpiła śmierć rośliny, glifosat musi być przemieszczony do tkanek merystematycznych pędu i korzeni. Ten proces, wystąpił w przypadku roślin wrażliwych przymiotna kanadyjskiego. Natomiast w roślinach odpornych mechanizm odporności polega na zaburzeniu w transporcie preparatu w roślinie. Glifosat nie przemieszczał się do tkanek merystematycznych, a wraz z prądem wstępującym wody był transportowany do końca blaszki liściowej, która uległa zniszczeniu. Natomiast nie została uszkodzona tkanka merystematyczna stożka wzrostu. W przypadku roślin odpornych na glifosat pomimo, że liście giną, stożek wzrostu oraz pozostała część rośliny nie są uszkodzone. Dlatego wyrosły nowe liście, nastąpił wzrost i dalszy rozwój roślin, co zaobserwowano po 7 tygodniach od zabiegu. Wyniki z wykonanej obserwacji ilustruje rysunek 1., ponadto wykonano fotografię (rys. 3). Podobny efekt działania glifosatu na odporne biotypy przymiotna kanadyjskiego podają Koger i Reddy (2005), Shields i wsp. (2006) oraz Yuan i wsp. (2010).

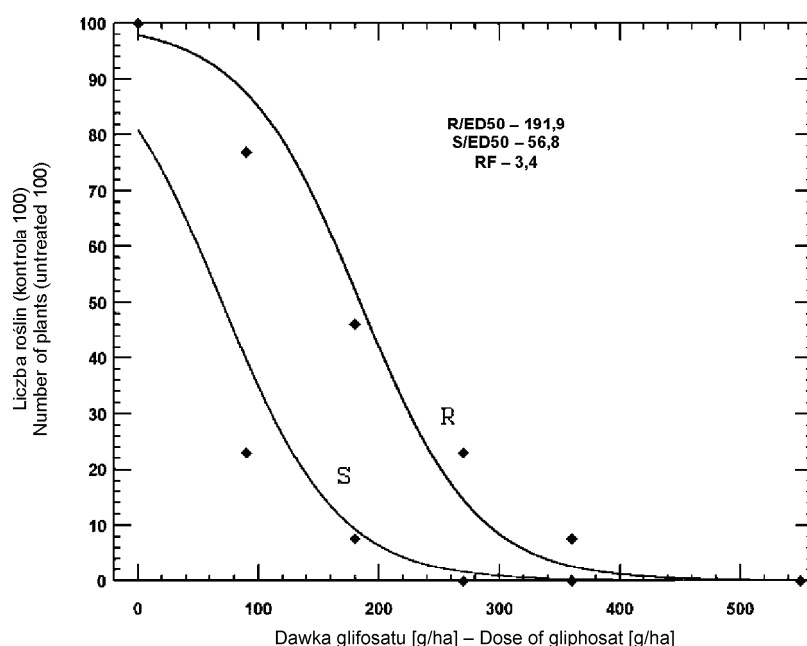


Rys. 1. Wpływ glifosatu na % ubytku zielonej masy biotypu wrażliwego (S) i odpornego (R) *C. canadensis* po 3, 5 i 7 tygodniach od zabiegu

Fig. 1. Influence of glyphosate on % of green mass reduction of susceptible (S) and resistant (R) biotypes of *C. canadensis* after 3, 5 and 7 weeks of application

Po 7 tygodniach od zabiegu policzono żywe rośliny oraz określono świeżą masę przymiotna kanadyjskiego obu biotypów. Na tej podstawie wykreślono krzywą zniszczenia, a uzyskane wyniki podano na rysunku 2. Uzyskanie 50% zniszczenia roślin biotypu odpornego (R) przymiotna kanadyjskiego wymagało użycia prawie 192 g glifosatu, a dla biotypu wrażliwego (S) tylko 57 g na ha tego herbicydu (rys. 2). Współczynnik odporności wynosił 3,4. Rośliny na kontroli biotypu odpornego (R) miały większą masę niż biotypu wrażliwego (S). Masa 13 roślin biotypu odpornego (R) wynosiła 6,65 g, a biotypu wrażliwego – 5,14 g. Shrestha i wsp. (2010) podaje, że odporne bioty-

py przymiotna kanadyjskiego wytwarzają większą masę i są wyższe od biotypów wrażliwych. Uzyskane różnice wrażliwości badanych biotypów nie były duże, ale statystycznie istotne. Na torach kolejowych, gdzie zebrano rośliny do badań, występowały one nielicznie, co wskazuje na początek procesu uodporniania się przymiotna kanadyjskiego na glifosat.



Rys. 2. Wpływ glifosatu na zmniejszenie liczby roślin biotypu wrażliwego (S) i odpornego (R) *C. canadensis*

Fig. 2. The effect of glyphosate on plant number reduction of susceptible (S) and resistant (R) biotypes of *C. canadensis*

Celem pomiaru retencji było sprawdzenie czy badane biotypy różnią się także ilością zatrzymanej cieczy roboczej na powierzchni liści. Uzyskane wyniki wskazują, że ilość cieczy roboczej na powierzchni liści dla biotypu odpornego (R) była od 10,8% dla dawki glifosatu 180 g/ha do 11,9% dla dawki 360 g/ha większa, niż dla biotypu wrażliwego (tab. 1). Różnica ta wystąpiła także w przypadku kontroli (standardu), ale była znacznie mniejsza, wynosiła bowiem 6,4%. Uzyskane dane wskazują, że ilość cieczy roboczej na liściach biotypu odpornego była większa od biotypu wrażliwego, co wskazuje na zróżnicowanie powierzchni blaszek liściowych. W opracowaniu pod redakcją Riederera i Muleler (2006) można znaleźć informację, że w wyniku wieloletniego stosowania herbicydów zmiana ulega powierzchnia blaszek liściowych, a w szczególności struktura kutikuli, co może mieć wpływ na retencję cieczy roboczej. Mimo zwiększonej ilości cieczy roboczej na powierzchni liści biotypu odpornego nie miało to wpływu na

zmianę wrażliwości roślin przymiotna kanadyjskiego na glifosat. Jest to także dodatkowym potwierdzeniem występowania odporności tego chwastu na glifosat.



3 tygodnie po zabiegu – 3 weeks after application



5 tygodni po zabiegu – 5 weeks after application



7 tygodni po zabiegu – 7 weeks after application

Rys. 3. Działanie glifosatu na biotyp wrażliwy (S) i odporny (R) *C. canadensis*, 3 terminy obserwacji. Objaśnienie: 1 – kontrola, 2 – 90 g/ha, 3 – 180 g/ha, 4 – 270 g/ha, 5 – 360 g/ha glifosatu

Fig. 3. Influence of glyphosate on susceptible (S) and resistant (R) *C. canadensis* biotypes, 3 dates of observation. Explanation: 1 – untreated, 2 – 90 g/ha, 3 – 180 g/ha, 4 – 270 g/ha, 5 – 360 g/ha of glyphosate

Tabela 1. Wpływ glifosatu na retencję cieczy opryskowej na liściach biotypu wrażliwego i odpornego *C. canadensis*Table 1. Influence of glyphosate on spray solution retention on *C. canadensis* leaves for sensitive and resistant biotype

Herbicyd Herbicide	Dawka Dose [l/ha]	Biotyp wrażliwy (S) Biotype sensitive (S)		Biotyp odporny (R) Biotype resistant (R)	
		[ $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ]	[%]	[ $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ]	[%]
Glifosat – Glifosate	180	1,86	100	2,06	110,8
Glifosat – Glifosate	360	1,85	100	2,07	111,9
Kontrola (standard) Control (standard)	0	1,73	100	1,84	106,4

#### IV. WNIOSKI

1. W Polsce, na torach kolejowych, stwierdzono występowanie przymiotna kanadyjskiego odpornego na glifosat.
2. Charakter obserwowanych uszkodzeń na biotypie odpornym wskazuje, że mechanizm odporności na glifosat może być związany ze zmianami przemieszczania się tego herbicydu w roślinach przymiotna kanadyjskiego.
3. Biotyp odporny charakteryzował się zwiększoną retencją cieczy roboczej.
4. Fakt występowania odporności stwarza potencjalne zagrożenie dla stosowania glifosatu do zwalczania roślinności na torach kolejowych w Polsce.

#### V. LITERATURA

- Colwill L., Hawkes T., Williams P.H., Wamer S., Sutton P., Powles S., Preston C. 1999. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. Pesticide Sci. 55: 489–491.
- Kaundun S.S., Zelaya I.A., Dale R.P., Lycett A.J., Carter P., Aharples K.R., McIndoe E. 2008. Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*) population from Philippines. Weed Sci. 56: 637–646.
- Koger C.H., Reddy K.N. 2005. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). Weed Sci. 53: 84–89.
- Nandula V.K. (ed.). 2010. Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management. John Wiley and Sons, Inc., Publication, 344 pp.
- Riederer M., Muleler C. 2006. Biology of the Plant Cuticle. Blackwell Publishing, 438 pp.
- Robertson J.R., Preisler H.K., Russell R.M. 2002. Polo Plus. Probit and Logit Analysis user's Guide 2002. LeOre Software, Petaluna, CA, 36 pp.
- Shields E.J., Dauer J.T., Van Gessel M.J., Neumann G. 2006. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed collected in the planetary boundary layer. Weed Sci. 54: 1063–1067.
- Shrestha A., Hanson B.D., Fidelibus M.W., Alcorta M. 2010. Growth, phenology, and intraspecific competition between glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible horseweeds (*Conyza canadensis*) in the San Joaquin Valley of California. Weed Sci. 58: 147–153.
- Yuan J.S., Abercrombie L.G., Cao Y., Halfhill M.D., Zhou H., Peng Y., Hu J., Rao M.R., Heck G.R., Larosa T.J., Sammons R.D., Wang X., Ranjan P., Johnson D.H., Wadl P.A., Scheffler B.E., Rinehart T.A., Trigiano R.N., Stewart C.N. 2010. Functional genomics analysis of

- horseweed (*Conyza canadensis*) with special reference to the evolution of non-target-site glyphosate resistance. *Weed Sci.* 58: 109–117.
- Yuan J.S., Trenel P.J., Stewart C.N. 2007. Non-target site herbicide resistance: a family business. *Trends Plant Sci.* 12: 6–13.
- Van Gessel M.J. 2001. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Sci.* 49: 703–705.

KAZIMIERZ ADAMCZEWSKI, ROMAN KIERZEK, KINGA MATYSIAK

HORSEWEED (*CONYZA CANADENSIS* L.) GLYPHOSATE RESISTANT

**SUMMARY**

Greenhouse studies were established to investigate glyphosate resistance of horseweed (*Conyza canadensis*) to glyphosate. Seeds of horseweed were collected from plants grown on the railroad in the suburb of Poznan on the route to Pila. For weed control on that railroad glyphosate was used for many years. The obtained data from the experiments indicated that *C. canadensis* showed resistance to glyphosate. The dose-response curve and resistance index ED50 indicated that the level of resistance was 3.4. The resistant biotype was characterized by increased retention of spray solution. The uptake and translocation mechanisms of resistance were studied.

**Key words:** *Conyza canadensis*, glyphosate, resistance