

## Testiranje korovske vrste *Solanum nigrum* L. na rezistentnost prema triazinskim herbicidima

Milena Simić<sup>1</sup>, Kateřina Hamouzova<sup>2</sup>, Josef Soukup<sup>2</sup>, Özhan Boz<sup>3</sup>,  
Ana Nikolić<sup>1</sup>, Vesna Dragičević<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Slobodana Bajića 1, 11185 Beograd, Srbija

<sup>2</sup>University of Life Sciences, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources,  
Prague, Czech Republic

<sup>3</sup>Adnan Menderes University, Agricultural Faculty, Aydın, Turkey

### REZIME

Rezistentni biotipovi korova se najčešće javljaju nakon višegodišnje primene herbicida. Nakon zabrane primene atrazina, 2006. godine, u upotrebu je uveden terbutilazin, herbicid iz grupe triazina sa istim mehanizmom delovanja - zaustavljanjem procesa fotosinteze putem blokade transporta elektrona u PS II. Cilj rada je utvrđivanje rezistentnosti vrste *Solanum nigrum* L. na PS II inhibitore.

Semena *S. nigrum* su uzorkovana sa mesta na kojima nikada nisu primenjivani herbicidi (potencijalna S populacija) i sa mesta na kojima je atrazin primenjivan kontinuirano dugi niz godina (potencijalna R populacija). Herbicid na bazi terbutilazina (500 g l<sup>-1</sup> a.m.), je primenjen kao komercijalna formulacija u količinama 187,5, 375, 750 i 1500 g a.m. po ha, u fazi 4 lista korova. Fluorescencija hlorofila je zatim merena 1 sat, 1 dan i 2 dana nakon tretiranja i izračunata je maksimalna kvantna efikasnost PS II (Fv/Fm). Nakon toga, PCR analiza je sprovedena korišćenjem specijalno dizajniranih prajmera za *psbA* gen.

Biljke R populacije su bile tolerantnije na delovanje herbicida i razvile veću biomasu u odnosu na biljke S populacije. Vrednosti maksimalne kvantne efikasnosti (Fv/Fm) su, dan nakon primene terbutilazina u preporučenoj količini, bile veće kod biljaka R populacije (0,588) nego kod biljaka S populacije (0,405). Analiza sekvenci genoma nije pokazala da je došlo do promene u nukleotidu u specifičnom regionu *psbA* gena odgovornog za rezistentnost prema triazinskim herbicidima tako da nije potvrđeno da je osnova povećane tolerantnosti ili rezistentnosti vrste *S. nigrum* prema triazinskim herbicidima genetska modifikacija u mestu delovanja.

**Ključne reči:** *Solanum nigrum*, rezistentnost, triazini, fluorescencija, PCR analiza

## UVOD

Problemi sa populacijama korova rezistentnim prema herbicidima su pre svega vezani za zemlje sa intenzivnom tehnologijom gajenja useva. Ograničenja u inputima u sistemima gajenja, primena herbicida sa istim ili sličnim mehanizmima delovanja u dužem vremenskom periodu i smanjenje količina njihove primene, glavni su uzroci pojave rezistentnosti (Menne and Köcher, 2012). Oslanjanje na nekoliko mera za suzbijanje korova uz zanemarivanje principa iz sistema integriranih mera za kontrolu korova (Integrated Weed Management - IWM), direktno utiče na promene u korovskim zajednicama. Biotipovi korova rezistentni prema herbicidima se obično javljaju nakon stalne primene istih ili herbicida sa sličnim mehanizmom delovanja.

Jednogodišnja širokolisna vrsta *Solanum nigrum* je široko rasprostranjena u toplijim oblastima i širokoredim usevima, naročito u kukuruzu. Ova vrsta je jedna od najzastupljenijih u usevima kukuruza u Srbiji (Stanojević et al., 1996; Simić, 2003; Stefanović and Simić, 2006; Simić et al., 2012). Osim primenom mezotriona, ova dominantna vrsta je preživela sve ostale tretmane dimetenamidom (Vrbničanin et al., 2006). Osobnosti klijanja i nicanja *S. nigrum* kojima pogoduju svetlost i temperatura zemljišta iznad 15°C doprinose perzistentnosti ove vrste u usevima (Kremer and Lotz, 1998)

Herbicid iz grupe triazina, atrazin, se primenjivao za suzbijanje širokolisnih korova u kukuruzu u Zemun Polju od 1966. sve dok pre nekoliko godina (2006), njegova upotreba u Srbiji nije zabranjena zbog štetnog delovanja na okolinu. Nakon toga je uveden u upotrebu terbutilazin, aktivna materija iz grupe triazina sa istim mehanizmom delovanja – inhibicijom procesa fotosinteze u PS II. Terbutilazin je takođe namenjen suzbijanju jednogodišnjih širokolisnih vrsta korova u kukuruzu.

Generalno posmatrano, postoji nekoliko promena u biljkama koje ukazuju da se razvila rezistentnost – promena enzima za koji se herbicid vezuje u biljci, izmena metabolizma herbicida i smanjena i usporena translokacija herbicida (Neve, 2007). U većini slučajeva, rezistentnost prema triazinima je posledica promena, tj. genetske mutacije u mestu delovanja herbicida. Uobičajeno, atrazin se kompetitivno vezuje za D1 protein u PS II, sprečavajući transport elektrona do kinona (Qb), tj. inhibira protok elektrona u reakcionom centru (Arntzen et al., 1982). Kod rezistentnih mutanata, vezivanje triazina za mesto delovanja je značajno redukovano zbog mutacije u D1 proteinu na poziciji 264. Na ovom mestu je došlo do proste zamene aminokiseline serin sa glicinom i time je onemogućeno vezivanje molekula herbicida za protein u biljci (Sundby et al., 1993). Rezistentnost prema triazinskim herbicidima je utvrđena kod korovske vrste *S. nigrum* putem *in vivo* merenja fluorescencije hlorofila listova nakon primene atrazina (Salava et al., 2004). Ispitivanja su potvrdila zamenu aminokiseline Ser sa Gly na poziciji 264 u *psbA* genu *S. nigrum*. U mnogim slučajevima, rezistentni biotipovi imaju smanjeni intenzitet rastenja i manji „fitness” nego osetljivi (Holt et al., 1993), što nije zasnovano na genetskim predispozicijama već je najčešće posledica uopštenih razlika između populacija (Neve, 2007).

Uzimajući u obzir zastupljenost vrste *S. nigrum* u korovskim zajednicama useva kukuruza, neophodno je testirati njenu osetljivost i eventualno utvrditi određeni stepen rezistentnosti prema triazinskim herbicidima. Cilj rada je bio da se ispita pojava rezistentnosti kod vrste *S. nigrum* L. prema herbicidima inhibitorima fotosinteze u PS II.

## MATERIJAL I METODE

Eksperiment je izveden u polukontrolisanim uslovima tokom 2012. godine na Fakultetu za agrobiologiju, hranu i prirodne resurse u Pragu, Republika Češka. Semena ispitivanih populacija *S. nigrum* su uzorkovana u Zemun Polju, u jesen 2011. godine. Semena su prikupljena sa mesta gde herbicidi nikada nisu primenjivani (sa obodnih površina; potencijalna S populacija) i sa mesta na kojima je atrazin primenjivan u kontinuitetu više od 30 godina (sa obrađivane površine; potencijalna R populacija). Pre setve, semena obe populacije *S. nigrum* su hemijski tretirana radi prekidanja dormantnosti sa 50%-im rastvorom sumporne kiseline u trajanu od 1 minuta (Suthar et al., 2009). Semena su posejana u plastične čaše veličine 8×8×8 cm i to 12 semena u svaku čašu. Datum i procenat izniklih semena su utvrđeni za S i R populaciju, nakon čega je ostavljeno 5 biljaka u svakoj čaši. Herbicid sa aktivnom materijom terbutilazin (500 g l<sup>-1</sup> a.m.) je primenjen kao komercijalna formulacija u kabinetskoj prskalici u količini 187,5, 375, 750 (preporučena količina) i 1500 g a.m ha<sup>-1</sup> (dvostruka količina), u fazi četiri lista korova. Deset dana nakon tretiranja, izmerena je sveža i suva masa biljaka po čaši i podaci statistički obrađeni metodom analize varijanse (ANOVA) dok su razlike sredina poredene pomoću LSD-testa.

Fluorescencija hlorofila *S. nigrum* je merena na listovima koji su prethodno 15 minuta adaptirani na tamu sa 5 biljaka svakog biotipa 1 sat (1 H), jedan dan (1 D) i dva dana (2 D) nakon primene herbicida, aparatom Imaging PAM (Waltz, Germany). Utvrđivan je osnovni nivo fluorescencije (F<sub>0</sub>) kada su reakcioni centri PS II otvoreni merenjem jačine modifikovane svetlosti koja je dovoljno slaba (0,1 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) da ne indukuje nikakvu značajnu promenu fluorescencije. Zatim je meren maksimalni nivo fluorescencije (F<sub>m</sub>) kada su svi reakcioni centri PS II zatvoreni pomoću 2,5 s zasićenog pulsa na 10,000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Maksimalni kvantni prinos PS II (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) je zatim izračunat prema Genty et al. (1989), F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> = (F<sub>m</sub>-F<sub>0</sub>)/F<sub>m</sub> gde je F<sub>0</sub> minimalni, a F<sub>m</sub> maksimalni kvantni prinos fluorescencije hlorofila.

DNK je izolovana iz mladih listova 5 pojedinačnih biljaka, kako od S tako i od R populacije *S. nigrum*, korišćenjem Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany). Primenjena je metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) u cilju utvrđivanja promene ili mutacije u D1 proteinu kod potencijalno rezistentnog biotipa (*psbA* gen).

Specifični prajmeri za *psbA* gen su dizajnirani na osnovu sekvenci gena *S. nigrum* (GenBank accessions X01651 i U25659: *psbA2F*(3'-AATCGGTCCGGAAGTTTTTC-5') i *psbA2R*(3'-TTCCATACCAAGGTTAGCACG-5')) korišćenjem Primer3 programa (Rozen and Skaltsky, 2000). Prajmeri su sintetisani od strane Sigma-Aldrich, Germany. Smeša za PCR analizu se sastojala od 1 μl DNK uzorka, 1 μM svakog prajmera, 200 μM dNTP-ova, 2,5 μl 10×PCR pufera

(Fermentas, Lithuania), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> i 0.5 U Taq DNA polimeraze (Fermentas, Lithuania). Amplifikacija je izvedena u automatskom aparatu (Thermal cycler C1000, BioRad ) prema sledećem programu: 3 minuta inicijalne denaturacije na 97°C, 30 ciklusa denaturacije u trajanju od po 30 sekundi na 97°C, 30 ciklusa vezivanja prajmera u trajanju od po 1 minut na 55°C, i 30 ciklusa elongacije u trajanju od po 1 minut i 30 sekundi na 72°C. Završna elongacija izvedena je u trajanju od 8 minuta na 72°C. Proizvodi amplifikacije su razdvojeni elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu uz dodavanje etidijum bromida za bojenje. Vizualizacija fragmenata urađena je pod UV svetlom i dokumentovana korišćenjem Cleaver microdocumentation jedinice.

Produkti PCR reakcije prečišćeni su korišćenjem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), a sekvenciranje je izvedeno u GATC Biotech (Nemačka). Sekvence osetljivog i rezistentnog biotipa su poređene u programu BLAST (Altschul et al., 1997).

## REZULTATI

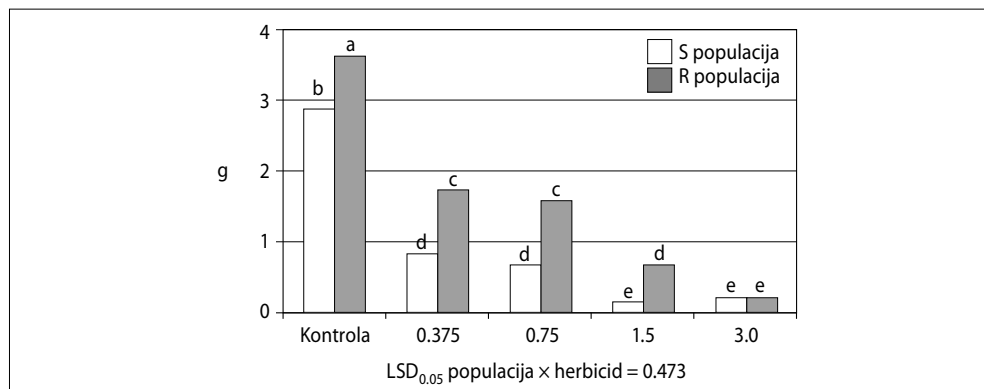
Utvrđeni rezultati pokazuju da je klijanje semena bilo bolje u čašama sa potencijalno rezistentnom, R populacijom *S. nigrum* u kojima je, u proseku, od 12 semena izniklo 7,20 biljaka. U čašama sa potencijalno osetljivom, S populacijom broj iskljajalih semena je bio, u proseku, 4,95, (tabela 1).

**Tabela 1.** Broj izniklih biljaka S i R populacije *S. nigrum*

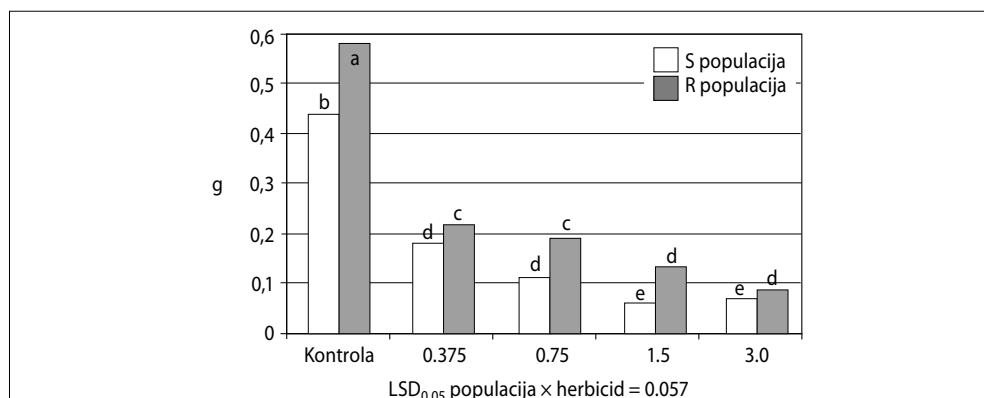
Populacija	Količine herbicida					
	Kontrola	0,375	0,75	1,5	3,0	Prosek
S	5,0	5,25	5,30	4,75	4,50	4,95
R	6,25	7,25	7,00	8,75	6,75	7,20

Biljke potencijalne R populacije *S. nigrum* su slabije reagovala na primenu svih doza terbutilazina osim najveće. Deset dana nakon primene herbicida, sveža i suva biomasa biljaka S i R populacije po čaši su bile manje nego na netretiranoj kontroli. Biomase R populacije su manje redukovane nego biomase S populacije nakon primene svih doza terbutilazina, (grafikon 1 i 2). Sveža biomasa je bila za 20,5% veća kod biljaka R nego S populacije na netretiranoj kontroli a 79,5% nakon primene preporučene količine herbicida. Razlike u biomasi nisu bile značajne nakon primene herbicida u smanjenim količinama od 0,375 i 0,75 l/ha terbutilazina.

Maksimalni kvantni prinos PS II tj. Fv/Fm vrednosti su bile, dan nakon primene herbicida, iste za obe populacije kod netretiranih biljaka (0,765 i 0,765) ali veće za biljke R (0,588) nego S populacije (0,405) pri primeni preporučene količine terbutilazina (Tabela 2). Vrednosti Fv/Fm nakon primene herbicida u količinama 0,375 i 0,75 su takođe bile veće za R (0,635, 0,581) nego za S populaciju (0,617, 0,546), ukazujući na činjenicu da biljke R populacije imaju u određenom stepenu razvijenu rezistentnost. Čak i pri primeni herbicida u dva puta većoj količini od preporučene, Fv/Fm vrednosti su veće za biljke R (0,470) nego S populacije (0,406).



**Grafikon 1.** Sveža biomasa (g) S i R populacije *S. nigrum* 10 dana nakon primene herbicida

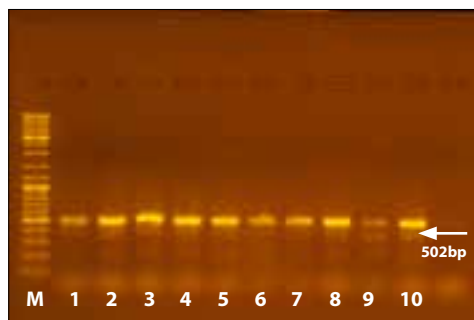


**Grafikon 2.** Suva masa (g) biljaka S i R populacije *S. nigrum* 10 dana nakon primene herbicida

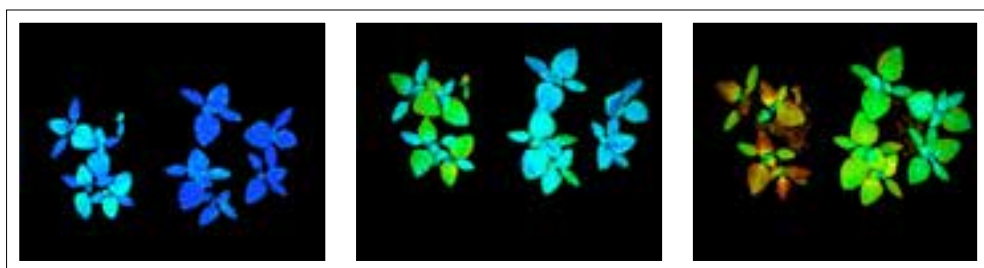
**Tabela 2.** Efikasnost PS II kod S i R populacije *S. nigrum* 1 dan nakon primene herbicida

Populacija	Herbicid	Fo	Fm	Fv/Fm
S	Kontrola	0,145	0,617	0,765
	0,375	0,209	0,546	0,617
	0,750	0,220	0,485	0,546
	1,5	0,259	0,435	0,405
	3,0	0,258	0,434	0,406
	Prosek	0,218	0,503	0,548
R	Kontrola	0,149	0,632	0,765
	0,375	0,202	0,554	0,635
	0,750	0,217	0,517	0,581
	1,5	0,218	0,530	0,588
	3,0	0,222	0,419	0,470
	Prosek	0,202	0,530	0,608

Različita reakcija S i R populacija je utvrđena merenjem fluorescencije listova već nakon jednog dana od primene herbicida (Slika 1). Jedan sat nakon tretiranja biljaka *S. nigrum* preporučenom količinom terbutilazina, biljke S populacije (levo na slici) su imale izmenjenu boju listova u poređenju sa biljkama R populacije (desno na slici) koje su imale intenzivniju boju listova. Sledećeg dana, boja listova se menjala znatno brže i nakon dva dana od tretiranja, boja listova potencijlno osetljive populacije *S. nigrum* se potpuno izmenila do skoro crvene. To ukazuje da je proces fostosinetzte u listovima osetljive S populacije skoro zaustavljen zbog delovanja terbutilazina.



**Grafikon 3.** Elektroforegram umnoženih fragmenata primenom prajmera psbAF2 i psbAR2 kod *S. nigrum* – M – DNK marker SM0333, 100bp (Fermentas, Lithuania); 1-5 uzorci S i 6-10 uzorci R populacije *S. nigrum*; strelica ukazuje na poziciju i veličinu amplifikovanog fragmenta



**Slika 1.** Vrednosti Fv/Fm u listovima *S. nigrum* 1h, 1 dan i 2 dana posle primene herbicida u preporučenoj količini

Amplifikacijom genoma DNK *S. nigrum* pomoću prajmera psbAF2 i psbAR2 su dobijeni fragmenti veličine 502 bp za oba biotipa (grafikon 3).

Sekvence regiona *psbA* gena dužine 502 bp osetljivih i rezistentnih genotipova *S. nigrum* nisu se razlikovale po zameni nukleotida na poziciji 264 i u ovom radu nije pokazano da je otpornost zasnovana na prisustvu mutacije u genu za D1 protein koja onemogućava vezivanje triazina.

## DISKUSIJA

Broj izniklih biljaka i sveža i suva biomasa potencijlno osetljive i rezistentne populacije *S. nigrum*, su pokazali da su biljke rezistentne populacije imale bolje nicanje, što se razlikuje od rezultata nekih prethodnih ispitivanja (Sibony and Rubin, 2003; Salava et al., 2004). Potencijalno rezistentne biljke su imale veću svežu i suhu biomasu nego osetljive, čak i na netretiranoj kontroli, ukazujući da se radi više o razlikama između populacija uzrokovanim uslovima staništa nego genetski baziranim (Neve, 2007).

Fluorescencija hlorofila je imala različite vrednosti u listovima potencijalno osetljive i rezistentne populacije ukazujući da je razvijen određeni stepen rezistentnosti prema triazinskim herbicidima kod korovske vrste *S. nigrum*. Veće vrednosti maksimalnog kvantnog prinosa fluorescencije, Fv/Fm, za biljke R populacije u odnosu na biljke S populacije čak i nakon primene dvostruko veće količine terbutilazina, su najverovatnije rezultat odsustva blokade u transportu elektrona u PS II koja se dešava kod osetljivih biljaka (Dominguez et al., 1994). Generalno posmatrano, merenjem maksimalnog kvantnog prinosa fluorescencije, Fv/Fm, mogu se detektovati različite vrste stresa kod biljaka. Optimalne vrednosti kvantnog prinosa (Fv/Fm) se kreću od 0,7 do 0,8 (Ritchie, 2006) i postojane su tokom vegetacionog perioda biljaka i u toku dana, kao što je utvrđeno za netretirane biljke *S. nigrum*. Smanjenje vrednosti (oko 0,6) uzrokovano je nekim jakim stresom kao što je primena herbicida, u ovom slučaju tretiranjem *S. nigrum* biljaka terbutilazinom. Biljke R populacije su imale veće vrednosti maksimalnog kvantnog prinosa (Fv/Fm) u poređenju sa biljkama S populacije, što ukazuje na činjenicu da su zadržale svoju aktivnost u PS II i nakon primene terbutilazina i da su razvile rezistentnost (Hamouzova et al., 2011). Slične rezultate istraživanja u Srbiji, dobili su Janjić i sar. (1988) pri analizi fluorescencije kod korovske vrste *Amaranthus retroflexus* gde je vrednost Fv/Fm opadala sa povećanjem koncentracije i dužine delovanja atrazina kod biljaka sa netretiranih površina, dok kod biljaka sa tretiranih površina opadanje Fv/Fm odnosa nije utvrđeno.

Utvrđeni rezultati su bili osnova za sprovođenje daljih molekularnih analiza za potvrdu rezistentnosti *S. nigrum*. Međutim, analizom sekvenci nije uočena zamena nukleotida na poziciji 264 *psbA* gena kojom bi se potvrdila rezistentnost *S. nigrum* prema triazinskim herbicidima (Salava et al., 2004). Tačnije, mutacija u genskoj sekvenci koja dovodi do zamene aminokiseline serin u glicin usled koje dolazi do rezistentnosti nije detektovana. Nije potvrđeno da je postojeća rezistentnost koju su pri merenju fluorescencije pokazale biljke R populacije *S. nigrum*, zasnovana na genetskim mutacijama.

Sprovedena ispitivanja su ukazala na postojanje izvesnog stepena rezistentnosti prema triazinskim herbicidima kod korovske vrste *S. nigrum* sa lokaliteta Zemun Polje, Beograd. Da bi se precizno potvrdilo postojanje rezistentnosti i njena osnova neophodna su dalja precizna ispitivanja na molekularnom nivou.

## ZAHVALNICA

Zahvaljujemo se Odseku za agroekologiju i bimeteorologiju Fakulteta za agrobiologiju, hranu i prirodne resurse u Pragu, Republika Češka (Department of Agroecology and Biometeorology, Faculty of Agrobiological Sciences, Food and Natural Resources, Prague, Czech Republic) na pomoći u sprovođenju eksperimenta. Istraživanja su takođe pomognuta od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije kroz projekat III 46008.

## LITERATURA

- Arntzen, C.J., Pfister, K., Steinback, K.E.:** The mechanism of chloroplast triazine resistance: Alternations in the site of herbicide action. In: LeBaron H.M., Greessel J. (eds.): *Herbicide Resistance in Plants*. Wiley, New York, 1982.
- Délye, C., Matějček, A., Gasquez, J.:** PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud). *Pest Management Science*, 58, 474-478, 2002.
- Dominguez, C., Tena, M., De Prado, R.:** Photosynthetic activity, growth and productivity in a s-triazine-resistant biotype of *Solanum nigrum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 32, 627-632, 1994.
- Hamouzova, K., Salava, J., Soukup, J., Chodova, D., Košnarova, P.:** Weed Resistance to Herbicides in the Czech Republic: History, Occurrence, Detection and Management. In: Hasaneen M. N. Abd El-G. (Ed.), *Herbicides-Mechanisms and Mode of Action*, InTech, 83-102, 2011. ISBN 978-953-307-744-4
- Holt, J.S., Powles, S.B., Holtum, J.A.M.:** Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology*, 44, 203-229, 1993.
- Janjić, V., Veljović, S., Jovanović, L.J., Plesničar, M., Arsenović, M.:** Utvrđivanje rezistentnosti *Amaranthus retroflexus* L. prema atrazinu primenom metode fluorescencije listova. *Fragmenta herbologica Jugoslavica*, 17, 45-54, 1988.
- Kremer, E. and Lotz, L.A.P.:** Germination and emergence characteristics of triazine susceptible and triazine-resistant biotypes of *Solanum nigrum*. *Journal of Applied Biology*, 35, 302-310, 1998.
- Menne, H. and Köcher, H.:** HRAC Classification of Herbicides and Resistance Development. In: Tadros, T.F. (Ed.), *Modern Crop Protection Compounds*, Vol. 1: Herbicides, (2 ed.) Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, 5-28, 2012.
- Neve, P.:** Challenges for herbicide resistance evolution and management: 50 years after Harper. *Weed Research*, 47, 365-369, 2007.
- Ritchie, A.G.:** Chlorophyll Fluorescence: What Is It and What Do the Numbers Mean? In: Riley L.E., Dumroese R.K., Landis T.D., (Ed.), *Forest and Conservation Nursery Associations National Proceeding RMRS-P-43*. Fort Collins, CO, USA, 2006. <http://www.rngr.net/nurseries/publication/proceedings>.
- Stanojević, M., Stefanović, L., Vasić, G., Videnović, Ž.:** Effects of planting density on weediness of maize in some locations of Serbia. *Proceedings of the 5th Serbian Weed Control Congress*, June, 18-21, Banja Koviljača, 311-320, 1996.
- Salava, J., Chodova, D., Novakova, K.:** The Emergence of a Atrazine Resistant Black Nightshade (*Solanum nigrum* L.) Biotype and Molecular Basis of the Resistance. *Plant Protection Science*, 40, 94-100, 2004.
- Sibony, M. and Rubin, B.:** Molecular basis for multiple resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides and atrazine in *Amaranthus blitoides* (prostrate pigweed). *Planta*, 216, 1022-1027, 2002.
- Simić, M.:** The seasonal dynamics of the weed community, competitiveness and productivity of maize within the integrated weed management system. PhD thesis, University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, 1-199, 2003.
- Simić, M., Brankov, M., Dragičević, V., Videnović, Ž., Kresović, B.:** Maize weed infestation under different soil tillage systems and fertilization levels. *Herbologija*, Sarajevo, 13 (1), 59-72, 2012.
- Stefanović, L., Simić, M.:** Changes in maize weed community during the last ten years. *Plant Science*, 43, 533-537, Sofia, Bulgaria, 2006.
- Sundby, C., Chow, W.S., Anderson, M.A.:** Effects on Photosystem II Function, Photoinhibition, and Plant Performance of the Spontaneous Mutation of Serine-264 in the Photosystem II Reaction Center D1 Protein in Triazine-Resistant *Brassica napus* L. *Plant Physiology*, 103, 105-113, 1993.
- Suthar, A.C., Naik, V.R., Mulani, R.M.:** Seed and Seed Germination in *Solanum nigrum* Linn. *American-Euroasian Journal of Agriculture & Environment Science*, 5, 179-183, 2009.



Vrbničanin, S., Stefanović, L., Simić, M., Uludag, A.: Reproductive Capacity of Jimsonweed (*Datura stramonium* L.), Redrot Pigweed (*Amaranthus retroflexus* L.) and Black Nightshade (*Solanum nigrum* L.) under Different Herbicide Regimes in Maize. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2(6), 332-335, 2006.

## Testing of black nightshade (*Solanum nigrum* L.) on resistance to triazine herbicides

### SUMMARY

Herbicide resistant weed biotypes usually occur after repeated application of herbicides. Atrazine was used in Serbia for many years and after its ban in 2006, herbicides with the same mode of action containing terbuthylazine started to be used for control of broadleaved annual weeds in maize. The aim of the study was to test sensitivity of *Solanum nigrum* L. to PS II inhibiting herbicides.

Seeds of the tested populations were sampled from sites on which atrazine had been continuously used (R) and from sites on which herbicides had never been used before (S). The PSII herbicide terbuthylazine (500 g l<sup>-1</sup> a.i.) was applied as a commercial formulation by cabinet sprayer at rates of 187.5, 375, 750 and 1500 g of a.i per ha at the 4 leaves stage, and the chlorophyll fluorescence was measured one hour, one day and two days after treatment. Maximum quantum efficiency of PS II photochemistry (Fv/Fm) was calculated. The PCR analysis was also conducted with designing of specific primers for *psbA* gene.

The R population plants were more tolerant than S population after application of all terbuthylazine rates, except for the highest. One day after herbicide application, the Fv/Fm values were higher for R (0.588) than for S population (0.405) at recommended rate. The sequence analysis did not show the nucleotide exchange in the specific region of the *psbA* gene responsible for resistance and we did not prove that the resistance is target site based.

**Key words:** *Solanum nigrum*, resistance, triazines, fluorescence, PCR analysis