

Učinak reduciranih doza tienkarbazon-metila i fenolnih kiselina na klijanje ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia* L.)

Nikolaš, Veronika

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:930340>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

**UČINAK REDUCIRANIH DOZA TIENKARBAZON-
METILA I FENOLNIH KISELINA NA KLIJANJE AMBROZIJE
(*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Veronika Nikolaš, bacc. ing. agr.

Zagreb, rujan, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Fitomedicina

**UČINAK REDUCIRANIH DOZA TIENKARBAZON-
METILA I FENOLNIH KISELINA NA KLIJANJE AMBROZIJE
(*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Veronika Nikolaš, bacc. ing. agr.

Mentor:

prof. dr. sc. Maja Šćepanović

Zagreb, rujan, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Veronika Nikolaš**, JMBAG 0068233829, rođen/a 30.01.2000. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**UČINAK REDUCIRANIH DOZA TIENKARBAZON-METILA I FENOLNIH KISELINA NA
KLIJANJE AMBROZIJE (*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA L.*)**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Veronika Nikolaš**, JMBAG 0068233829, naslova

**UČINAK REDUCIRANIH DOZA TIENKARBAZON-METILA I FENOLNIH KISELINA NA
KLIJANJE AMBROZIJE (*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* L.)**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. prof. dr. sc. Maja Šćepanović mentor

2. prof. dr. sc Klara Barić član

3. prof. dr. sc Aleksandar Mešić član

Zahvala

Ovim putem zahvaljujem prof. dr. sc. Maji Šćepanović na velikoj pomoći i stručnom vodstvu tijekom izrade ovoga projekta i pisanja diplomskoga rada, na pruženoj prilici vođenja demonstratura na kolegiju Osnove herbologije, kao i na svakom poticaju za prijavu za sudjelovanje na Seminaru biljne zaštite. Hvala Vam puno, bez Vas ljubav prema korovima ne bi bila ovolika.

Asistentici Pismarović i kolegici Emi, s kojima je bio proveden ovaj projekt, hvala na svakoj pomoći prilikom postavljanja pokusa, vođenju pokusa i očitavanju rezultata.

Hvala od srca mentorici stručne prakse Nives Maršić. Hvala na potpuno novom, drugačijem pogledu na struku. Hvala na svom prenesenom znanju, hvala na pruženoj prilici odrađivanja prakse kod Vas i s Vama, te hvala najljepša na svojoj podršci. Hvala na jednom od najljepših iskustva tokom studiranja.

Hvala mojim roditeljima, sestrama Petri, Margareti i Valentini te cijeloj obitelji na podršci i bezuvjetnom vjetru u leđa tijekom cijeloga studija, a posebice ove dvije godine diplomskoga studija. Hvala vam što ste razumjeli svako odricanje i napor te uvijek bili tu uz mene.

Hvala mojim najbližijim curama, Valentini i Ivoni. Hvala za sve - svaki upit, brigu i interesiranje oko moga fakulteta, iako smo u dijametralno suprotnim krajnostima obrazovanja. Hvala vam, moje.

I za kraj, posebno hvala mom suprugu Ivanu. Hvala ti što si me gurao dalje i kada ja nisam mogla, i kada nisam vidjela smisao i širu sliku cijele situacije. Hvala ti što si mi bio najveća moguća podrška u najtežoj i najgoroj godini koja nas je zadesila. Hvala ti što si uvijek vjerovao u mene najviše moguće i kada ja sama nisam, hvala ti što si tješio i držao leđa. Potvrdio si mi davno donesenu odluku. Bez tebe sigurno ne bih bila tu gdje jesam. Hvala ti.

Sadržaj

1.	UVOD	3
1.1	Hipoteze i ciljevi istraživanja	5
2.	PREGLED LITERATURE.....	6
2.1	Ambrozija (<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.)	6
2.2	Ekonomska važnost korovne vrste <i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.	11
2.3	Pokrovni usjevi porodice <i>Brassicaceae</i>	12
2.4	Fenolne kiseline- potencijalni bioherbicidi	13
2.5	Tienkarbazon- metil (TKM)	15
3.	MATERIJALI I METODE RADA	17
3.1	Prikupljanje sjemena ambrozije	17
3.2	Biotest.....	17
3.3	<i>Preliminarni pokus</i>	17
3.4	<i>Dose-response pokus</i>	20
3.5	Statistička obrada podataka	20
4.	REZULTATI	21
4.1	<i>Preliminarni pokus</i>	21
4.2	<i>Dose-response pokus</i>	28
5.	RASPRAVA	33
6.	ZAKLJUČAK	38
7.	LITERATURA:	39

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Veronika Nikolaš**, naslova

UČINAK REDUCIRANIH DOZA TIENKARBAZON-METILA I FENOLNIH KISELINA NA KLIJANJE AMBROZIJE (*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* L.)

Poljoprivredna proizvodnja suočava se s mnogim pritiscima, uključujući smanjenje kemijskih sredstava za zaštitu bilja. Suzbijanje korova zahtijeva nove, učinkovite mjere s povoljnijim ekotoksikološkim svojstvima. Fenolne kiseline, grupa biljnih fenola, pokazuju inhibicijski učinak na korovne vrste. Prethodna istraživanja identificirala su tri fenolne kiseline (*p-kumarinska*, *vanilinska*, *ferulinska*) s najjačim inhibitornim učinkom na korovnu vrstu *Ambrosia artemisiifolia* L. (ambrozija). Cilj ovoga *in vitro* istraživanja jest utvrditi učinak fenolnih kiselina u istovremenoj primjeni s reduciranim dozama herbicida tienkarbazon-metila na klijanje i početni rast ambrozije. Rezultati preliminarnog pokusa ukazuju na to da *p-kumarinska* kiselina (200×10^{-7}) u kombinaciji s 1/8 dozom herbicida tienkarbazon-metila značajno bolje inhibira duljinu hipokotila ambrozije u odnosu na ostale fenolne kiseline. Dodatkom *p-kumarinske* kiseline herbicidu tienkarbazon-metilu, radikula ambrozije se značajno više reducirala (92,4%) u odnosu na herbicid bez dodatka *p-kumarinske* kiseline (86,1%). Kod najnižih dozacija herbicida (1/32 x i 1/64 x) utvrđena je značajno bolja redukcija hipokotila ambrozije kod primjene kombinacije herbicida i *p-kumarinske* kiseline, u odnosu na herbicid bez dodatka *p-kumarinske* kiseline. Rezultati istraživanja ukazuju na mogućnost smanjenja doze tienkarbazon-metila kada se kombinira s *p-kumarinskom* kiselinom, no istraživanje je potrebno provesti i u *in vivo* uvjetima.

Ključne riječi: *p-kumarinska* kiselina, pokrovni usjevi, limundžik, tienkarbazon-metil

Summary

Of the master's thesis – student **Veronika Nikolaš**, entitled

EFFECT OF REDUCED DOSES OF THIENCARBAZONE-METHYL AND PHENOLIC ACIDS ON THE GERMINATION OF AMBROSIA (*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA L.*)

Agricultural production is facing many pressures, including the reduction of chemical plant protection agents. Weed control requires new, effective measures with more favorable ecotoxicological properties. Phenolic acids, a group of plant phenols, show an inhibitory effect on weed species. Previous research has identified three phenolic acids (p-coumaric, vanillic, ferulic) with the strongest inhibitory effect on the weed species *Ambrosia artemisiifolia L.* (ambrosia). The aim of this *in vitro* research is to determine the effect of phenolic acids in simultaneous application with reduced doses of the herbicide thien carbazone-methyl on the germination and initial growth of ragweed. The results of the preliminary experiment indicate that p-coumaric acid (200×10^{-7}) in combination with 1/8 dose of the herbicide thien carbazone-methyl inhibits the hypocotyl length of ragweed significantly better than other phenolic acids. With the addition of p-coumaric acid to the herbicide thien carbazone-methyl, ragweed radicles were significantly reduced (92.4%) compared to the pure herbicide without the addition of p-coumaric acid (86.1%). At the lowest dosages of herbicides (1/32 x and 1/64 x), a significantly better reduction of ragweed hypocotyls was found when applying the combination of herbicide and p-coumaric acid compared to the pure herbicide. The results of the research indicate the possibility of reducing the dose of thien carbazone-methyl when combined with p-coumaric acid, but the research needs to be carried out in *in vivo* conditions as well.

Key words: p-coumaric acid, phenolic acids, cover crops, lemongrass, thien carbazone-methyl

1. UVOD

Ambrozija (*Ambrosia artemisiifolia* L.) je jedna od najvažnijih invazivnih biljaka koja je raširena na širokom području Amerike, Azije i Europe. Ova jednogodišnja širokolisna korovna vrsta predstavlja značajan problem u poljoprivredi, ali i medicini zbog svojih jakih alergogenih svojstava (Knolmajer i sur., 2024). Polen ambrozije može uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme kod ljudi sklonih alergijama, što rezultira velikim troškovima za zdravstvo. Ambrozija se brzo širi zahvaljujući svojoj sposobnosti prilagodbe raznim okolišnim uvjetima i različitim metodama širenja, uključujući antropogeno širenje (Makra i sur., 2015), vodu, vjetar i životinje.

Zbog velike prisutnosti ambrozije u gotovo svim poljoprivrednim usjevima, kao i nepoljoprivrednim površinama, potrebne su intenzivne mjere suzbijanja. Osim mehaničkih mjera suzbijanja (košnja, kultivacija i sl.), najučestalije mjere suzbijanja su učinkovita kemijska sredstva za zaštitu (herbicidi). Međutim, učestala primjena herbicida istog mehanizma djelovanja često rezultira pojavom rezistentnih populacija korova. Tako je, primjerice, u SAD-u utvrđena rezistentnost ambrozije na herbicide imazamoks i nikosulfuron u usjevu soje, te na imazamoks u usjevu kukuruza. U Ukrajini je pak utvrđena rezistentnost na tienkarbazon-metil, jodsulfuron i nikosulfuron u usjevima suncokreta. U susjednoj Republici Srbiji također je utvrđena rezistentnost ambrozije na djelatne tvari tienkarbazon-metil, tribenuron i imazamoks koji se primjenjuju u usjevima kukuruza, soje i suncokreta. U Francuskoj je zabilježena rezistentnost na djelatne tvari metsulfuron- metil, tribenuron te imazamoks koji se primjenjuju u usjevu soje, suncokreta i slanutka (Heap, 2024). Ni Republika Hrvatska nije iznimka, pa je tako utvrđena rezistentnost ambrozije na nekoliko herbicida iz skupine sulfonilureja (Šćepanović i sur., 2020).

Tienkarbazon-metil je herbicid koji se učestalo primjenjuje u Republici Hrvatskoj u usjevima kukuruza, u kombinaciji s djelatnom tvari izoksafutol u herbicidnom pripravku Adengo. On suzbija širokolisne i uskolisne korove, a njegovo se djelovanje očitava u vidu prestanka rasta, prestanka dioba stanica i izduživanja tkiva, a ti su simptomi rezultat mehanizma djelovanja inhibicije acetolaktat sintaze (ALS) ili acetohidroksidacid sintaze (AHAS). Biljka usvaja ovu djelatnu tvar korijenom i listom (Barić i sur., 2024).

Kao odgovor na zahtjeve Europske Unije (EU) o smanjenju unosa svih pesticida u okoliš, potrebno je pronaći nove mjere suzbijanja koje su učinkovite poput herbicida, a istovremeno i povoljnih ekotoksikoloških svojstava. Direktiva o održivoj uporabi pesticida i Europski zeleni plan nalažu uvođenje novih mjera suzbijanja štetnih organizama koje su manje oslonjene na primjenu pesticida. Kao jedno od potencijalnih rješenja navode se bioherbicidi.

Široko definirani, bioherbicidi su proizvodi za suzbijanje korova koji se dobivaju iz živih organizama, uključujući sve prirodne proizvode koje živi organizmi proizvode tijekom rasta. Biljni metaboliti koje biljke izlučuju tijekom rasta nazivaju se alelokemikalije, a mogu pozitivno ili negativno djelovati na organizme u njihovoj okolini (Scavo i sur., 2019). Glavnu skupinu biljnih alelokemikalija čine fenoli (Li i sur., 2010), a istraživanja ukazuju da fenoli imaju inhibitorski učinak prema korovnim vrstama. Tako Reigosa i sur. (1999) navode da je najveća koncentracija fenolnih spojeva (10mM) inhibirala klijanje korovnih vrsta *Chenopodium album*

L., *Plantago lanceolata* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Solanum nigrum* L., *Cirsium* sp. i *Rumex crispus* L., dok niže koncentracije (0,01-1 mM) nisu imale nikakav učinak, ili su bile stimulatívne. Zaključeno je da su učinci varirali ovisno o vrsti korova, koncentraciji fenolnih spojeva, ali i o samome spoju. Tako su Stupnicka- Rodzynkiewicz i sur. (2006) utvrdili najveću osjetljivost korovnih vrsta *Echinochloa crus-galli* i *Galinsoga parviflora* u slučaju folijarne aplikacije *p*-hidroksibenzojeve, protokatehuinske i vanilinske kiseline. Ostale fenolne kiseline nisu inhibirale rast korovnih vrsta *Setaria viridis* i *Chenopodium album*. U ovom istraživanju također je utvrđeno da *ferulinska* kiselina i *p*-kumarinska kiselina inhibiraju koncentraciju fotosintetskih pigmeneta kod korovne vrste *Echinochloa crus-galli* u nadzemnim dijelovima, dok je *vanilinska* kiselina uzorkovala manjak klorofila a i b kod korovne vrste *Chenopodium album*.

U istraživanju Šćepanović i sur. (2022), utvrđen je inhibicijski učinak *vanilinske*, *p*-kumarinske, *ferulinske* i *p*-hidroksibenzojeve kiseline na klijanje i početni rast ambrozije, ali je inhibicijski učinak značajno varirao u ovisnosti o dozaciji fenolnih kiselina. Isti autori također navode da u nižim dozama, a posebice u onim dozama u kojima se prirodno nalaze u biljnim tkivima, nije moguće učinkovito suzbiti ovu korovnu vrstu.

Navedena istraživanja ukazuju na to da bi se učinkovito suzbijanje korovnih vrsta moglo postići jedino kombiniranom primjenom bioherbicide s drugim mjerama borbe. Jedna od mogućnosti je istražiti učinak fenolnih kiselina sa značajno smanjenim dozama herbicide (Šćepanović i sur., 2022.).

Stoga, cilj ovoga *in vitro* istraživanja jest utvrditi učinak tri fenolne kiseline: *ferulinska*, *p*-kumarinska, *vanilinska* u kombinaciji s reduciranim dozama herbicide tienkarbazon- metila na klijanje te početni rast ambrozije.

1.1 Hipoteze i ciljevi istraživanja

Na temelju pregleda literature, formulirane su hipoteze *in vitro* istraživanja:

- 1.) Primjenom reducirane doze herbicida tienkarbazon-metila (39,6 g/ha) u kombinaciji s fenolnim kiselinama (*p-kumarinska*, *ferulinska* i *vanilinska*), ostvarit će se jači inhibicijski učinak u odnosu na istu dozu herbicida bez fenolnih kiselina. Jačina inhibicijskog učinka ovisit će o vrsti i dozi primijenjene fenolne kiseline.
- 2.) Kombinacijom reduciranih doza herbicida tienkarbazon-metila u kombinaciji sa selektiranom fenolnom kiselinom, inhibirat će se klijanje ambrozije jednako ili bolje u odnosu na punu (registiranu) dozu herbicida.

Ciljevi istraživanja su sljedeći:

- 1.) Utvrditi klijavost i duljinu radikule ambrozije primjenom tri doze fenolnih kiselina s reduciranim dozama herbicida tienkarbazon- metila (39,6 g/ha) u *in vitro* uvjetima.
- 2.) U *in vitro* uvjetima utvrditi klijavost i duljinu radikule ambrozije primjenom selektirane fenolne kiseline s reduciranim dozama herbicida (sedam linearno padajućih), kao i primjenom istih linearno padajućih doza herbicida bez fenolne kiseline.

2. PREGLED LITERATURE

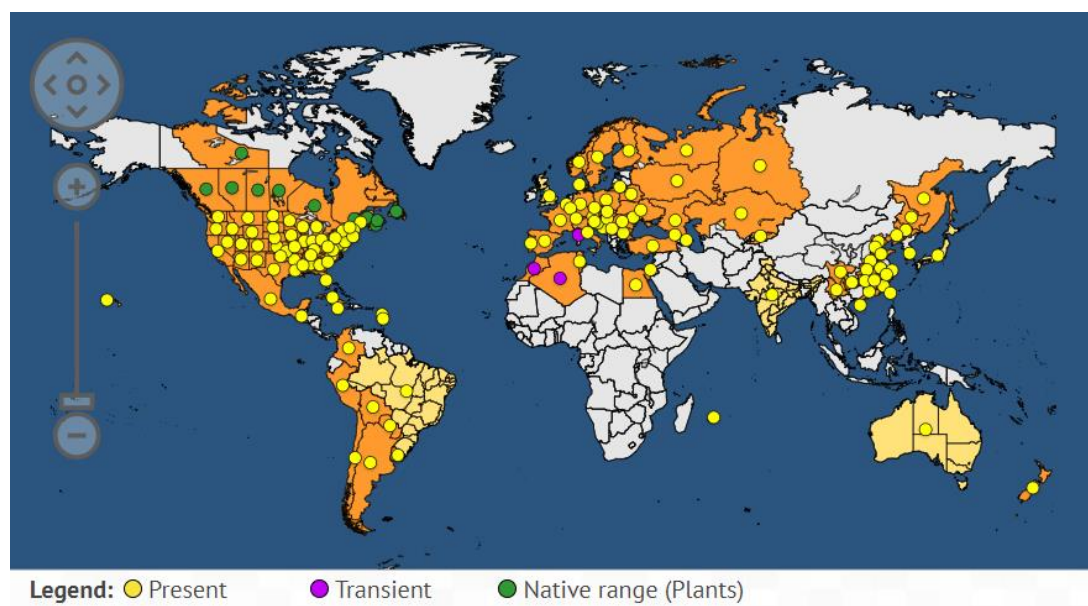
2.1 Ambrozija (*Ambrosia artemisiifolia* L.)

Ambrozija (*Ambrosia artemisiifolia* L.) je jedna od najvažnijih invazivnih biljaka, rasprostranjena na širokom području Amerike, Azije i Europe. Ova vrsta je vrlo invazivna te ima značajan negativan utjecaj na poljoprivredu i medicinu, posebice zbog problema koje uzrokuje u zdravlju ljudi (Knolmajer i sur.,2024). Kod ljudi sklonih alergijama, polen ambrozije uzrokuje brojne probleme, a u konačnici i globalni problem – kako po pitanju suzbijanja, tako je i uzročnik velikoga financijskog troška koji odlazi upravo na ovu invazivnu biljku. To je jednogodišnja, širokolisna, proljetno-ljetna korovna vrsta koja je jedan od najistaknutijih poljoprivrednih korova (Knolmajer i sur.,2024). Zbog svojih osobina kompeticije, alelopatije i lake prilagodljivosti, ambrozija je prisutna posvuda, kao što su poljoprivredni usjevi, putovi te neobrađene površine. Kao što je to odlika svih korova, i ambrozija ima širok ekološki spektar što joj omogućava prilagodbu na različite okolišne uvjete.

Porijeklom ambrozije smatra se pustinja Sanora, koja se proteže sjeverno i zapadno od Kalifornijskog zaljeva te pripada području Arizone (Knolmajer i sur., 2024). U pustinji Sanora poznato je desetak vrsta ambrozija. Prvi je puta otkrivena 1838. godine te je postala veoma raširenom korovnom vrstom u Sjevernoj Americi, a zastupljena je sve do juga Kanade. U ostatku svijeta prisutna je u Europi gdje uzrokuje goleme probleme, te Indiji, Australiji, Kini i Japanu. Trenutno je u svijetu poznata 41 vrsta roda *Ambrosia* (slika 2.1.), od kojih uz vrstu *A. artemisiifolia* najveću prijetnju uzrokuju *A. trifida* i *A. psyllostachya* (Kazinczi i Novák, 2012).

Pregledom herbarija botaničkih vrtova, utvrđeno je da je Republika Francuska bila prva zemlja u Europi gdje se ambrozija udomaćila 1763. godine (Chauvel i sur.,2006), a prvo štetno djelovanje na polju utvrđeno je 1863. godine. Iz Francuske je nastavila svoj put širenja, nakon čega je 1890. utvrđena u okolnim zemljama. U Rusiji je njena prisutnost zabilježena 1918. godine, a pretpostavlja se da je u te krajeve dospjela međunarodnom trgovinom. Budući da je pronađena uz željezničke pruge, trgovina robom putem željeznica objasnila bi tu pretpostavku, a odatle se širila na poljoprivredna polja (Genton i sur., 2005). Prvo zapažanje ambrozije u Ukrajini bilo je 1914. godine, zatim se nastavila širiti u Kijev (1925.), Harkov (1929.), Odessu (1936.) te Zaporožje (1939.) (Afonin i sur., 2018). Smatra se unesenom vrstom u Mađarskoj, Francuskoj i Italiji, te je dalje raširena u Njemačku, Švicarsku, Austriju, Poljsku, Slovačku, Tursku te na Korejskom poluotoku (Kazinczi i sur. 2008; Keszthelyi i sur., 2022). U Mađarskoj se ambrozija smatra vodećom korovnom vrstom koja je dospjela na područje države nakon Drugog svjetskog rata, tijekom obrane Mađarske. Sjeme ambrozije vrlo se lako širilo prometnim pravcima, cestama i željeznicama te se zahvaljujući tome vrlo uspješno udomaćila (Knolmajer i sur., 2024). Prema dosadašnjim podacima, budući da nije uspostavila svoju ekološku nišu, dokazano je da na ambroziju negativno djeluju europske iznenadne vrućine i ljetne suše jer onemogućuju njeno lako i uspješno širenje (Case i Stinson, 2018).

Sjeme ambrozije širi se na razne načine. Najčešći put širenja je uz pomoć čovjeka, odnosno antropogeno širenje. Može se, također, širiti vodom, gdje u velikoj brojnosti može dospjeti na nova mjesta za vrijeme poplave. Moguće je širenje i posredstvom životinja, primjerice ptica koje se hrane različitim sjemenom, pa tako i sjemenom ambrozije. Vjetar omogućuje sjemenu ambrozije dospijeće na tlo u neposrednoj blizini majčinske biljke, što omogućava ulazak sjemena u banku sjemena u tlu. Antropogeno širenje označava dospijeće kontaminiranog sjemena koje je zatim zakorovljuje usjeve, kao i prisutnost na neadekvatno očišćenim strojevima, prikolicama i sredstvima kojima se vršila obrada i mehanizacija (Makra i sur., 2015).



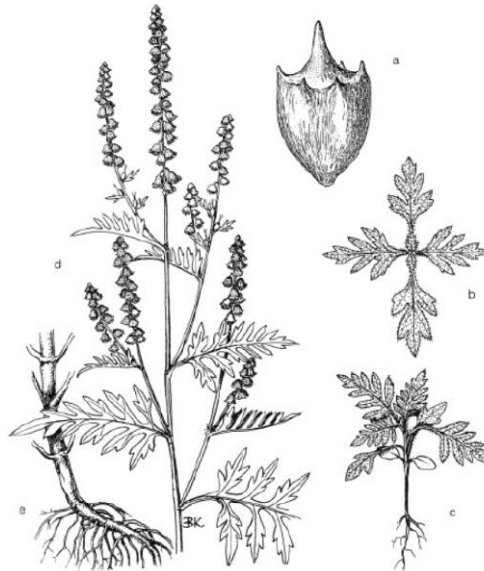
Slika 2.1. Prikaz distribucije vrste *Ambrosia artemisiifolia* L.

Izvor: EPPO <https://gd.eppo.int/taxon/AMBEL/distribution> -pristup: 8.5.2024.

Ambrosia artemisiifolia L. je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice glavočika (*Asteraceae*) (slika 2.2). Visine je od 120 do 140 cm, razgranatog habitusa te dlakave stabljike. Listovi imaju kratke peteljke i oni mogu biti sjedeći do dvopeteljčani (Knolmajer i sur., 2024). Muški cvjetovi su u obliku grozda na vrhu izbojaka, dok su ženski cvjetovi smješteni niže u pazušcima listova. Plod se naziva roška, a sjeme je oblika obrnuto jajolikog, široko ovalnog sa zupcima na vrhu. Sjeme je sivkasto-smeđe boje. Pojedine jedinice ambrozije imaju isključivo ženske cvjetove, te time ne stvaraju polen koji je uzrok problema u medicini, ali također i u poljoprivredi. Ambrozija je poznata po svoja tri varijeteta: var. *artemisiifolia*, var. *elatior* i var. *paniculata* (Knolmajer i sur., 2024).

Kotiledoni ambrozije su jajastog oblika i peteljka je kratka, dok su pravi listovi nasuprotni i režnjeviti, a ostali mladi listovi su raspršeni (Csontos i sur., 2010). Listovi se morfološki mogu veoma razlikovati, na što utječe starost lista. Zbog morfološkog izgleda lista, ova se korovna

vrsta u vrtovima može lako zamijeniti s kadifom (*Tagetes patula*), ili čak rajčicom (*Solanum lycopersicon*) te crnim pelinom (*Artemisia vulgaris*) (Kazinczi i sur.,2009).



Slika 2.2. Morfologija vrste *Ambrosia artemisiifolia* L. a-sjeme; b-pravi listovi odozgo; c-mlada biljka s pravim listovima; d- cvjetni izboji; e- stabljika s korijenom

Izvor: MDPI <https://www.mdpi.com/2073-4395/14/3/497> -pristup: 8.5.2024.



Slika 2.3. Prikaz invazije ambrozije u usjevu suncokreta

Izvor: Research and Reflection Ring on Pesticide Resistance <https://www.r4p-inra.fr/en/ragweed-sunflower/> - pristup 10.5.2024.

Na našim područjima, nicanje ambrozije započinje krajem ožujka, no vrhunac nicanja je od sredine travnja do sredine svibnja te može nicati periodički sve do prvih mrazeva u područjima umjerene klime, kao što je slučaj Hrvatske (Béres i Hunyadi, 1980). Temperatura je glavni ekološki čimbenik koji utječe na klijanje i nicanje (Dickerson, 1968). Vrijeme nicanja određuje produkciju sjemena. Jedinka koja nikne u travnju može imati sjemensku produkciju od 3000 do 4000 sjemena po biljci, dok one kasnije jedinke koje niknu u kolovozu mogu imati veoma skromnu produkciju s 12-16 sjemenki po biljci (Béres i Bíró, 1993). Osim temperature, na klijanje i nicanje biljke također utječu i izmjena temperature, svjetlost, vlaga te koncentracija CO₂ (Essl i sur., 2015). Na odgodu klijanja utječu i niske temperature, vlažni uvjeti i nedostatak svjetlosti, kao i prevelika koncentracija soli (Guillemin i Chauvel, 2011).

Ovisno o zemlji porijekla, težina sjemena varira od 4,7 mg do 8,8 mg (Hall i sur., 2021). Prema istraživanjima Šoštarčić i sur. (2020) s dvije populacije s područja Hrvatske (Jastrebarsko, Popovača), utvrđena je intrapopulacijska varijabilnost između veličine sjemena ambrozije. Prosječna masa 1000 sjemenki ambrozije na lokalitetu Jastrebarsko iznosila je 4,05 g, a s lokaliteta Popovača 4,54 g. Prema istraživanju Guillemin i Chauvel (2011), utvrđeno je značajno variranje mase sjemena unutar jedne populacije koja iznosi od 1,2 mg pa sve do 7,7 mg, te prosječna masa sjemena od 4,08 g. Međutim, utvrđeno je da težina sjemena ne utječe na klijavost, dok starost sjemenki utječe. Tako, primjerice, mlađe sjemenke mogu ranije klijati od starijih (Guillemin i Chauvel, 2011; Hall i sur., 2021).

Sjeme ambrozije može proklijati iz dubine od 7 cm i više, ali neće niknuti, te mlade biljke ugibaju u trenutku potrošnje hrane iz endosperma (Makra i sur., 2015). Prema istraživanjima Guillemin i Chauvel (2011.), najveća dubina iz koje je iznikla biljka ambrozije bila je 8 cm. Prema istraživanju Sanga i sur. (2011.), iz dubine od 4 cm proklijalo je 75% sjemenki, dok je sjeme s dubine 6 cm proklijalo samo u 2,5 -0,5 % slučajeva te je time zaključeno da svjetlost uvelike pomaže u klijanju ambrozije. Sjeme koje je bilo izloženo svjetlosti 12 sati, niknulo je u 97% slučajeva, a ono sjeme iz tame niknulo je u nešto manjem postotku od 75% (Szigetvári i Benkő, 2004; Magyar, 2023). Sjeme je pokazalo najveću klijavost kada je bilo izloženo temperaturi za nicanje između 23 i 25 °C, te u periodu izloženosti svjetlosti od 12 sati. Béres (1981) je utvrdio da je optimalna temperatura za klijanje ambrozije u laboratorijskim uvjetima naizmjenice 10/23°C.

Kao što je poznato, sjeme svake korovne biljke može u banci sjemena biti veoma dugo dormantno. Ambrozija je vrsta duge dormantnosti u banci sjemena, od 20 godina (Silc, 2002) pa čak i do 0-35 godina (Chikoye i sur., 1995; Oberdorfer, 2021). Primarna dormantnost sjemena svježe ubranoga u listopadu, završava u siječnju ili veljači naredne godine (Béres i Hunyadi, 1984). Prekid dormantnosti može se postići hladnom stratifikacijom u trajanju od 15 tjedana. Najpoželjnije su temperature između 4 i 11°C tijekom 15 tjedana, kako bi se prekinula primarna dormantnost sjemenki (Baskin i Baskin, 1987). Klijavost se smanjuje duljim pohranjivanjem sjemena na hladnom i mračnom mjestu.

Ambrosia artemisiifolia L. pripada C3 fotosintetskom tipu biljaka (Fumanal i sur., 2008). Vegetativni rast i razvoj započinje u svibnju i lipnju (Béres i Hunyadi, 1980), a najveći vrhunac proizvodnje vegetativne biomase odvija se sredinom srpnja, i odvija se do vrhunca cvatnje u

kolovozu i rujnu (Kazinczi i Novák, 2012). Za optimalan rast izdanaka smatra se temperatura od 29,5 do 31,4 °C, dok se biljka prestaje razvijati na temperaturi većoj od 43°C (Shrestha i sur., 1999). Prema istraživanjima, biljke koje su iznikle ranije u travnju, nisu imale velik utjecaj interspecijskih i intraspecijskih odnosa, dok one koje su kasnije iznikle (krajem ljeta), bile su izložene većoj kompeticiji zbog čega proizvode manje suhe biljne mase (Knolmajer i sur., 2024).

Cvatnja ambrozije potiče se kontinuiranim smanjenjem duljine dana nakon ljetnog solsticija. Vrijeme cvatnje je odgođeno ako je fotoperiod duži od 14 sati (Essl i sur.,2015). Na jednoj biljci, omjer muških i ženskih cvjetova uglavnom je 50:50, ali se omjer pomiče zbog kasnog nicanja (Béres i Hunyadi, 1980).

Vjetar je glavno sredstvo načina širenja sjemena, a za dobivanje zrelog sjemena potrebno je 40 do 60 dana nakon oplodnje (Makra i sur., 2015). Ambrozija nema posebnu strategiju širenja sjemena, što znači da većina sazrelog sjemena pada unutar dva metra od jedinke (Szigetvári i Benkó, 2004, Dickerson, 1968). Cvatnja muških cvjetova započinje u srpnju te može trajati do 2-2,5 mjeseca. Ženski cvjetovi ulaze u cvatnju dva tjedna nakon muških cvjetova, te njihova cvatnja traje do prvih mrazeva (Mátyás i sur., 2020). Prema poznatim podacima iz dosadašnjih istraživanja, dokazano je da u hladnijim klimatima biljke ambrozije krenu ranije cvjetati i cvatnja traje duže (Stinson i sur.,2018). Kao što je vegetativni rast ambrozije veći pri višim temperaturama, u skladu s time veća je i koncentracija muških cvjetova, što rezultira i većom produkcijom polena (Knolmajer i sur., 2024). Ovaj proces uzrokuje veću problematiku u medicini, a valja napomenuti da je i uzročnikom većih stopa alergijskih reakcija i oboljenja ljudi.

Upravo su klimatske promjene te koje mogu uzrokovati fiziološke, biokemijske i fenološke promjene na biljci koja se nalazi na određenom području koje je podložno djelovanju klimatskih promjena (Sun i sur., 2020; Behrendt i Ring, 2012). Kao posljedica klimatskih promjena, očekuje se da će se ambrozija širiti prema sjeveru, odnosno klimatima na kojima se postupno povisuju temperature, čime postaju savršena staništa jer se nepovoljni uvjeti za ambroziju mijenjaju u povoljne (Knolmajer i sur.,2024). Zbog sve viših temperatura u proljeće, dolazit će do ranijeg nicanja ambrozije. Kao posljedica ranijeg nicanja, cvatnja i raspršivanje polena započet će ranije, čime će se i razdoblje raspršivanja produljiti (El Kelish i sur., 2014). Klimatske promjene mogu značajno djelovati i na međusobno djelovanje ambrozije i njenih prirodnih neprijatelja. Jedan od takvih primjera je kukac *Ophraella communa*. Budući da se mijenja ambrozija u fenološkim fazama, može doći do pomaka u generacijama prirodnog neprijatelja (Knolmajer i sur., 2024). Zbog klimatskih promjena može doći do poremećaja u životnom ciklusu, odnosno, zbog toplijih jeseni i dovoljne vlažnosti, može se dogoditi da dođe do pojave nicanja ambrozije u jesen, s obzirom na to da su temperatura i optimalna vlažnost tla zadovoljeni (Knolmajer i sur., 2024). Iako mlade biljke ambrozije ne preživljavaju zimske uvjete i mrazove, one mogu biti konkurenti kasnojletnim i jesenskim usjevima, kao što su ozima repica i ozime žitarice (Sun i sur., 2020).

2.2 Ekonomska važnost korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia* L.

Ambrozija se smatra sveprisutnom korovnom vrstom, odnosno, može se naći u gotovo svim ratarskim usjevima, uzrokujući u konačnici velike gubitke prinosa. Uz poljoprivredne površine, ambrozija je vrlo često prisutna na neobrađenim površinama, strništima, uz prometnice (kao što su željeznice i autoceste), na gradilištima te na terenima koji se remete i obrađuju (Kazinczi i sur., 2009). U Europi postoji nekoliko faktora koji jako pogoduju širenju ambrozije, a to su povećanje neobrađenih površina, kao i nedovoljno stručnog znanja, zatim povećanje vrtova kojima se ljudi bave u hobiju, pojava otpornih biotipova na herbicide te, na koncu, unos sjemena koje je zaraženo sa sjemenom ambrozije (Szigetvári Benkő, 2004).

Provedene su mnoge studije u kojima je dokazana izravna kompeticija ambrozije s usjevima. U usjevu suncokreta, jedna biljka ambrozije po četvornom metru uzrokuje gubitak prinosa od 7%. Kod dvije biljke ambrozije, taj je postotak iznosio 11%, kod pet biljaka 25%, a pri gustoći od deset biljaka po m² 37% (Béres i sur., 2007). Prema podacima istraživanja Knolmajer i sur. (2024), ambrozija bi mogla zauzeti 5,33% obradive površine u Mađarskoj, ukoliko se ne bi provodile mjere zaštite od ovoga invazivnog korova. Taj postotak označava 340 000 ha površine od ukupno 6,5 milijuna hektara obradive površine. Na temelju prosječnog prihoda od 862 EUR/ha, prisustvo ambrozije uzrokovalo bi gubitak prihoda od 293 milijuna EUR u 2012. (Szigetvári i Benkő, 2004.). U nepovoljnim vremenskim uvjetima, kada dolazi do odgađanja nicanja usjeva ili perioda suše, ambrozija ne pokazuje visoku stopu kompeticije. Također, ne utječe značajno na prinos žitarica, budući da postojeći negativni uvjeti nisu povoljni za njezin rast i razvoj. U slučajevima slabo uspostavljenog usjeva, zbog omogućene dominacije i širenja, može činiti značajne štete usjevima žitarica. Lehoczky i sur. (2011) istraživali su gustoću ambrozije na strništima pšenice tri tjedna nakon žetve. Ambrozija je stvorila prosječnu gustoću od 20,9 jedinki po m². Varga i sur. (2006) proučavali su kompeticiju između ambrozije i kukuruza. Prema rezultatima istraživanja, u slučaju deset jedinki ambrozije po m², količina uroda kukuruza smanjena je za 37%. Hall i sur. (2021) proučavali su učinak *A. artemisiifolia* na usjev soje. Ukupno pet jedinki ambrozije u posudi smanjilo je proizvodnju biomase sorte soje Albena za 11%, a proizvodnja biomase sorte Mentor bila je smanjena za 26% u odnosu na kontrolu. U vrijeme berbe, sorta Albena imala je 51% manju nadzemnu suhu masu, kada je u posudi bilo pet biljaka ambrozije u usporedbi s kontrolnim biljkama. Sorta Mentor imala je najmanji gubitak koji je iznosio 33% nadzemne suhe mase, kada je u posudi bilo pet jedinki ambrozije. Na temelju stakleničkih dvogodišnjih poljskih istraživanja, utvrđeno je da je na parcelama s najvećom biomasom ambrozije gubitak prinosa soje u prosjeku iznosio 84%, u usporedbi s kontrolnom parcelom bez korova (Hall i sur., 2021). Broj kvržica, kao i srednja masa kvržica koje su usko povezane s prinosom soje, značajno je smanjen na parcelama gdje je bila zastupljena ambrozija. Jedna biljka ambrozije po m² smanjila je broj kvržica za 56%, a u konačnici je dovela do smanjenja prinosa od 18% (Hall i sur., 2021).

Republika Hrvatska jedna je od tri europske zemlje koje imaju najveću gustoću peludi i sjemena ambrozije po jedinici površine (Lommen i sur., 2018). Ambrozija najveći problem stvara u jarim usjevima, gdje se najčešće suzbija kemijskim mjerama, odnosno herbicidima

(Galzina i sur., 2010). Međutim, učestalom primjenom herbicida istog mehanizma djelovanja te pojavom ambrozije u velikoj brojnosti, utvrđena je i u našoj zemlji rezistentnost ove vrste na nekoliko herbicida koji inhibiraju acetolaktat sintazu (takozvani ALS herbicidi) (Šćepanović i sur., 2021b).

Jeda od mjera mogućnosti suzbijanja invazivnih korova u poljoprivrednoj proizvodnji je inkorporacija pokrovnih usjeva u plodored. Zbog izraženih svojstava kompeticije i alelopatije, biljne vrste koje se nalaze u smjesama pokrovih usjeva mogu direktno utjecati na potiskivanje korova. Izlučivanjem sekundarnih biljnih metabolita, ove biljne vrste inhibiraju rast i razvoj korova. Uz sekundarne metabolite, kompeticijom za prostor, hranu, vodu i svjetlost, potiskuju se korovne vrste. Jedna od biljnih skupina s izraženim alelopatskim djelovanjem je porodica *Brassicaceae*. Jedne od brojnih aktivnih skupina su fenolne kiseline koje se odlikuju inhibitornim učinkom na određene biljne vrste, ali mogu djelovati i pozitivno na rast i razvoj.

2.3 Pokrovni usjevi vrstama iz porodice *Brassicaceae*

Porodicu *Brassicaceae* čini velik broj biljaka koje proizvode dosta visoke koncentracije biološki aktivnih spojeva (Haramoto i Gallandt, 2005; Brijačak i sur., 2020; Šćepanović i sur., 2021a) te se pripadnici ove porodice siju kao pokrovni usjevi. Uz funkcije kao što su zaštita od erozije, obogaćenje tla dušikom i mineralnim tvarima te sprječavanje gubitka topline i vlage, pokrovni usjevi utječu na potiskivanje korova. Uz ove navedene djelotvorne učinke, pokrovni usjevi mogu održavati povoljni odnos između ugljika i dušika, mogu povećati mikrobiološku aktivnost, kao i utjecati na optimalan vodnozračni odnos (Barić i Ostojić, 2020; Šćepanović i sur., 2023). Jedan od glavnih uvjeta ovih usjeva jest da nisu konkurentski usjevi glavnom usjevu. Najveća međusobna interakcija pokrovnog usjeva i kulture koja se uzgaja, u periodu je najvećeg razvitka biljne mase, odnosno, u periodu u kojemu korovi mogu najviše štetiti kulturi. Osim kompeticijom, sprječavanje klijanja i nicanja korova u usjevima događa se i zbog alelokemikalija prisutnih u biljnim tkivima ovih usjeva (Haramoto i Gallandt, 2005). Vrste porodice *Brassicaceae*, zbog izraženih alelopatskih svojstava, imaju važnu ulogu u suzbijanju korova (European Comission, 2019) te pripomažu u izvedbi i provođenju nekemijskih mjera suzbijanja.

Prema Europskom zelenom planu (European Green Deal) i Direktivi o održivoj uporabi pesticida (Direktiva 2009/128/EZ), u zaštiti bilja potrebno je pronaći nova povoljnija rješenja koja su nekemijska i povoljnih ekotoksikoloških svojstava, kao i uspostaviti održiv način suzbijanja štetnih organizama (Šćepanović i sur., 2023). Ciljna specifičnost i brza razgradnja bioherbicida u okolišu, zahtijevaju veću pozornost pri razvoju proizvoda dostupnog širokoj potrošnji (Scavo i Mauromicale, 2020).

Ukoliko bi se vrste pokrovnih usjeva, kao potencijalni bioherbicidi, učinkovito koristile u inhibiciji rasta i razvoja korova, potrebno je odrediti koja je vrsta spojeva odgovorna za inhibiciju rasta korova (Šćepanović i sur., 2022). Prema radu Šćepanović i sur. (2021a), testirana je inhibicija klijanja i rasta ambrozije nakon što se tretirala vodnim ekstraktima pokrovnih kultura iz porodice *Brassicaceae*, te se utvrdio inhibirajući učinak na rast i razvoj

ambrozije. Cilj pokusa bio je utvrditi učinak vodnih ekstrakata različitim koncentracijama (0;0,5;1; 2,5; 5; 7,5 i 10% (w/v)) na klijanje i rani rast ambrozije. Rezultat ovoga pokusa pokazao je da ekstrakti iz vrste *Camellina sativa* imaju inhibirajući učinak na klijanje, rast hipokotila, duljinu radikule te masu svježih biljaka ambrozije. Ekstrakti iz vrsta *Sinapis alba* i *Raphanus sativus* inhibirali su rast i razvoj ambrozije, ali samo pri koncentracijama višim od 7,5% (Šćepanović i sur., 2021a). Ono što je u konačnici potvrđeno jest da je u plodovima vrste *Camellina sativa* najveća koncentracija alelopatskih spojeva, te da je ova vrsta najpovoljniji pokrovni usjev koji je pokazao najveći inhibitorni učinak (Šćepanović i sur.,2021a).

2.4 Fenolne kiseline- potencijalni bioherbicidi

Glavnu skupinu biljnih alelokemikalija čine fenoli (Li i sur.,2010). Fenoli su pokazali svoje djelovanje na rast i širenje stanica, propusnost membrane, unos i usvajanje hranjivih tvari, na proces fotosinteze, djelovanje na sintezu proteina te na enzimsku aktivnost (Einhellig, 2004). Utvrđeno je da *p*-hidroksibenzojeva kiselina, *protokatehuinska* kiselina te *vanilinska* kiselina mogu usporiti rast koštana (*Echinochloa crus – galli*) i sitnocvjetne konice (*Galinsoga parviflora*) (Stupnicka-Rodzynkiewicz i sur.,2006). Također, *salicilna* kiselina, *ferulinska* kiselina, *hidroksibenzojeva* kiselina i *hidroksifenil octena* kiselina inhibirale su rast korovne vrste *Avena fatua* L. (Almaghrabi, 2012). Zahvaljujući rezultatima ovakvih pokusa, došlo se do zaključka da fenolne kiseline mogu biti potencijalni bioherbicidi (Li i sur., 2010; Stupnicka-Rodzynkiewicz i sur.,2006; Heidarzade i sur., 2012). No, pitanje koje se postavlja jest koje su to doze i koje kombinacije fenolnih kiselina koje uspješno suzbijaju korove. Većina istraživanja navodi da inhibirajući učinak fenolnih kiselina prema korovima ovisi o korovnoj vrsti, kao i o vrsti fenolnog spoja. Jedna od glavnih značajki po čemu se bioherbicidi ističu jest ta da ne zagađuju okoliš, vodu, tlo i ne ciljane organizme, što nije slučaj s kemijskim sredstvima zaštite (Šćepanović i sur., 2023).

U istraživanju Chen i sur. (2022), istražena su alelopatska svojstva vrste *Artemisia argyi* (kineski pelin, srebrnasti pelin). Budući da je ova vrsta široko rasprostranjena diljem Azije te na tom prostoru postiže dominantnu populaciju, upravo se njene alelokemikalije smatraju glavnim razlogom te dominacije. Utvrđen je inhibicijski učinak *A. argyi* na vrste: *Echinochloa crus- galli*, *Setaria viridis*, *Portulaca oleracea* i *Amaranthus retroflexus* (Chen i sur., 2022). U istom je istraživanju potom provedena kvalitativna i kvantitativna analiza kemijskog sastava vodenog ekstrakta *A. argyi*, kako bi se utvrdili alelopatski spojevi koji inhibiraju rast ovih korovnih vrsta. Utvrđena su četiri potencijalna alelopatska spoja: *neoklorogena* kiselina, *kafeinska* kiselina, *klorogena* i *kriptoklorogena* kiselina. Dobiveni rezultati pokazali su da je *kafeinska* kiselina glavni alelopatski spoj prisutan u kineskom pelinu koji inhibira rast ostalih biljnih vrsta. Detaljnije su proveli istraživanje primjenom *kafeinske* kiseline na listovima vrste *Setaria viridis*, gdje je utvrđen inhibitorni učinak regulacijom višestrukih gena uključenih u sintezu hormona giberelina i fitoaleksina.

Značajan bioherbicidni učinak zabilježen je i kod vrsta *Ulex europaeus* i *Cytisus scoparius* koje sadrže hlapljive spojeve herbicidnog učinka (Pardo- Muas i sur., 2020). Potvrđena je

herbicidna aktivnost flavonoida i fenolnih kiselina u aktivnosti obje vrste. Upravo ti spojevi dopijevaju u tekuću fazu tla nakon dospijeca lišća bogatog alelokemikalijama u tlo. Ispitivanjima u *in vitro* uvjetima dokazano je da obje vrste sadrže spojeve topive u vodi, koje inhibitorno djeluju na korovne vrste *Amaranthus retroflexus* i *Digitaria sanguinalis*. Kod vrste *U. europaeus* identificirano je 11 vrsta fenolnih kiselina, a kod vrste *C. scoparius* 17 fenolnih spojeva. U slučaju kada su zasebno ispitivane u *in vitro* uvjetima u dozi 1 mM, *trans-cimetna*, *p-kumarinska* i *ferulinska* kiselina pokazale su se fitotoksičnima za jedan ili drugi korov i fiziološke procese, te osim *kafainske* kiseline i *vanilina*, fenolne kiseline su izgubile učinkovitost pri primjeni u nižim koncentracijama (0,1 ili 0,01 mM).

U istraživanju provedenom 2015. godine, istraživana je stabilnost fenolnih kiselina i učinkovitost na suzbijanje korova u uzgoju riže (Li i sur., 2015). Ispitana su tri derivata benzojeve kiseline (*siringinska*, *4-hidroksibenzojeva* i *vanilijeva kiselina*) i tri derivata cimetne kiseline (*cimetna*, *4-hidroksicimetna* i *ferulinska kiselina*). Rezultati istraživanja pokazali su da se koncentracija pojedinačnih fenolnih kiselina i otopina miješanih fenolnih kiselina smanjila u određenoj mjeri. Po pitanju smanjenja, ono se pokazalo neovisnim o okolišu tj. biološkom testu (4-7 dana) ili okruženju uzgoja riže, a izmjereno je značajno smanjenje koncentracije nakon 48h (Li i sur., 2015). Rezultati su pokazali da su fenolne kiseline relativno nestabilni spojevi, što bi moglo utjecati na njihov bioherbicidni učinak. Autori, ipak, zaključuju da je bioherbicidni učinak bio značajniji kod primjene viših koncentracija fenolnih kiselina (Li i sur., 2015).

Fenolni spojevi se relativno lako izoliraju iz biljnih tkiva te su uglavnom topivi u vodi, što je razlog da se relativno često koriste u raznim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima. I u domaćoj znanstvenoj literaturi provođena su *in vitro* istraživanja s fenolnim spojevima (Šćepanović i sur., 2021a; Šćepanović i sur., 2022 ; Brijačak i sur., 2021.) i to upravo na korovnoj vrsti – ambroziji. Iz suhih biljnih dijelova vrsta por. *Brassicaceae*, tekućinskom kromatografijom izolirano je 15 fenolnih spojeva: *vanilinska kiselina*, *p-kumarinska kiselina*, *vanilin*, *hidroksibenzenska kiselina*, *klorogenska kiselina*, *galska kiselina*, *protocatehinska kiselina* i *siringinska kiselina*, od kojih su neki pokazali određena bioherbicidna svojstva (Šćepanović i sur., 2021a). Zaključno su četiri fenolne kiseline pokazale jači inhibitorni učinak na ambroziju: *p-kumarinska kiselina*, *ferulinska*, *vanilinska* i *p-hidroksibenzojeva kiselina* te mješavina svih fenolnih kiselina (Šćepanović i sur., 2022; Šćepanović i sur., 2023). U ovom istraživanju, fenolne kiseline primjenjivale su se u koncentracijama od 2 do 16 puta većim nego što su prirodno utvrđene u nadzemnim biljnim dijelovima *Brassicaceae* (Šćepanović i sur., 2021a), a inhibicijski učinak prema ambroziji ostvaren je tek pri najviše korištenim koncentracijama. Pritom, ove fenolne kiseline u *in vitro* i *in vivo* uvjetima nisu negativno utjecale na rast i razvoj kukuruza (Pismarović i sur., 2021.).

Iako su u navedenim istraživanjima utvrđeni inhibicijski učinci *vanilinske*, *p-kumarinske*, *ferulinske* i *p-hidroksibenzojeve* kiseline na klijanje i početni rast ambrozije, ovaj inhibicijski učinak značajno je varirao u ovisnosti o dozaciji fenolnih kiselina. Navedena istraživanja ukazuju da bi se učinkovito suzbijanje korovnih vrsta moglo postići jedino kombiniranom

primjenom bioherbicida s drugim mjerama borbe. Jedna od mogućnosti je istražiti učinak fenolnih kiselina sa značajno smanjenim dozama herbicida (Šćepanović i sur., 2022.).

Ovaj diplomski rad nastavak je dosadašnjih istraživanja, a u njemu su se selektirale fenolne kiseline s najvećim inhibicijskim potencijalom prema ambroziji. Sljedeći cilj je utvrditi koliki je učinak fenolnih kiselina u istovremenoj primjeni reduciranih doza herbicida tienkarbazon-metila.

2.5 Tienkarbazon- metil (TKM)

Prema Herbicide resistance action committee (HRAC)(2024), herbicid tienkarbazon-metil (TKM) pripada kemijskoj skupini triazolona koji mehanizmom djelovanja inhibiraju enzim acetolaktat sintazu (ALS) ili acetohidroksidacid sintazu (AHAS). Ti enzimi su zaduženi za sintezu valina, leucina i izoleucina u meristemskom tkivu. Sintaza se odvija u vršnom meristemu odakle se dalje premješta u kloroplaste. Enzim ALS je veoma aktivan u meristemskom tkivu mlade biljke. Sam proces sinteze aminokiselina veoma je složen. Iz piruvata ga katalizira niz od 4,5 enzima, od kojih je jedan ALS (Barić, 2024.). Reakcija biljke nakon primjene herbicida ove skupine jest brz prestanak rasta koji započinje unutar nekoliko sati, zaustavljaju se dioba stanica i izduživanje tkiva. Fotosinteza i stanično disanje odvijaju se još neko vrijeme, no biljka postupno odumire. Unutar ove skupine postoji više skupina inhibitora ovoga procesa, a to su: sulfonilureja herbicidi, imidazolinoni, triazolopirimidini i triazoloni. Kod osjetljivih vrsta, molekula herbicida se duže zadržava, odnosno perzistiraju duže u biljci.

Tienkarbazon-metil biljka apsorbira putem lista, ali i korijenom. LD50 > 2000 dolazi u kombinaciji s drugim djelatnim tvarima, kao što su mezosulfuron (Atlantis star), foramsulfuron (Moonsoon active), izoksaflutol (Adengo) te s tembotrionom (Capreno). Ova sredstva se primjenjuju za suzbijanje korova u usjevima kukuruza i strnih žitarica. Osjetljive vrste su: dvornici (*Polygonum* spp.), sitnocvjetna konica (*Galinsoga parviflora*), koštan (*Echinochloa crus-galli*), mišjakinja (*Stellaria media*), divlja zob (*Avena fatua*), zeleni muhar (*Setaria viridis*), jednogodišnja vlasnjača (*Poa annua*), kužnjak bijeli (*Datura stramonium*), ambrozija (*Ambrosia artemisiifolia*), bijela loboda (*Chenopodium album*), europski mračnjak (*Abutilon theophrasti*) i šćir (*Amaranthus retroflexus*) (Barić, 2024.).

U usjevima kukuruza, tienkarbazon-metil se učestalo koristi u pripravku Adengo (izoksaflutol (225 g/l), tienkarbazon-metil (90 g/l) i ciprosulfamid (157,1 g/l) (Bayer), te uspješno suzbija ambroziju, kao i niz jednogodišnjih uskolisnih i širokolisnih korova (Fitosanitarni informacijski sustav (FIS), 2024).

S obzirom na zahtjeve EU o redukciji unosa pesticida u okoliš, istraživane su mogućnosti redukcije primjene herbicida. Prema dosadašnjim istraživanjima, proučavana je redukcija doze herbicida uz kombinaciju mehaničkih mjera suzbijanja (usmjerena aplikacija u redu kukuruza uz međurednu kultivaciju), te su rezultati pokazali veoma povoljne postotke redukcije uporabe herbicida, točnije, 60% manje unosa herbicida (Loddo i sur., 2019; Šoštarčić i sur., 2020.).

Ideja ovoga rada proizašla je iz novih saznanja o djelovanju fenolnih kiselina kao inhibitornih spojeva na rast i razvoj invazivnih korova. Kao što je već dokazano da alternativne

mjere suzbijanja samostalno ne postižu visoku stopu inhibicije korovnih vrsta te da su dosadašnja istraživanja pokazala pozitivan utjecaj fenolnih kiselina na rast i razvoj ambrozije, ideja je kombinirati fenolne kiseline sa značajno reduciranim dozacijama herbicida.

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1 Prikupljanje sjemena ambrozije

Sjeme ambrozije koje se koristilo u pokusu prikupljeno je 2018. godine na pokušalištu Šašinovec, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (45°51'05.2" S, 16°10'34.1" I). Nakon što je sjeme očišćeno, spremljeno je u papirnate vrećice u hladnjak na 4°C, sve do provođenja pokusa. Prije postavljanja pokusa sjeme je kalibrirano, a ono sjeme koje je vizualno izgledalo mrtvo ili oštećeno od predatora bilo je odstranjeno. Prije početka istraživanja proveden je test klijavosti, a budući da je utvrđena klijavost bila veća od 70%, sjeme je bilo pogodno za nastavak istraživanja.

3.2 Biotest

3.3 Preliminarni pokus

Cilj preliminarnog pokusa bio je odabrati dozu fenolne kiseline koja će se primjenjivati u kombinaciji s reduciranim dozama herbicida. Ovaj pokus bio je dvofaktorijelni, s fenolnim kiselinama (*ferulinska*, *p-kumarinska* i *vanilinska*) kao prvim faktorom te dozama fenolnih kiselina (50, 100 i 200 x 10⁻⁷ mol) kao drugim faktorom.

Referentni standardi za ove tri fenolne kiseline dobiveni su od Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka). *Ferulinska* kiselina (FA)¹, *vanilinska* kiselina (VA) i *p-kumarinska* kiselina (PCA) otopljene su u destiliranoj vodi, svaka pojedinačno, te su potom sonirane na 35 kHz i 80°C (Sonorex TK 52, Bandelin, Njemačka), u svrhu postizanja ujednačenih, homogenih otopina u različitim dozama. Doze su izačunate na temelju prirodne prisutnosti ovih fenolnih kiselina u biljnim vrstama iz porodice *Brassicaceae* (*Sinapis alba* L., *Raphanus sativus* var. *oleiformis*, *Camelina sativa* L.) (Crantz) koje se siju kao pokrovni usjevi (Šćepanović i sur., 2021a). Sva potrebna vaganja za pokus vršila su se na analitičkoj vagi (MS105DU, Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska).

Sve tri doze fenolnih kiselina pripremljene su u kombinaciji s 1/8 x pune doze, koja iznosi 39,6 g /ha (x) tienkarbazon-metila (TKM), a kao pozitivna kontrola, korištena je ista doza herbicida, ali bez fenolnih kiselina. *In vitro* pokus postavljen je u petrijevim zdjelicama, gdje je na filter papir postavljeno po 25 sjemenki ambrozije. U svaku petrijevu zdjelicu promjera 90 mm, dodano je 4 mL otopine (fenolne kiseline plus herbicid; čisti herbicid – pozitivna kontrola i destilirana voda-negativna kontrola).

¹ *Ferulinska* kiselina - *trans* -4-hidroksi-3-metoksicimtna kiselina
Vanilinska kiselina (4-hidroksi-3-metoksibenzojeva kiselina)
p-kumarinska kiselina - *trans* -4-hidroksicimtna kiselina)

Petrijeve posudice zatvorene su parafilmom i postavljene u klima komoru (HPP 108, Memmert, Schwabach, Njemačka) u određenom režimu: fotoperiod 12 h/12 h; dnevna temperatura 25°C, a noćna 15°C; vlažnost 70% te intenzitet svjetla 40–50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (LED svjetlo). Nakon deset dana, mjerila se duljina radikule, hipokotila te brojnost klijavih sjemenki. Sjeme se smatralo klijavim ukoliko je duljina radikule bila veća od 1 mm. Nakon svih očitanih vrijednosti izmjeren je postotak inhibicije reflektiran kroz duljinu radikule i hipokotila, po formuli :

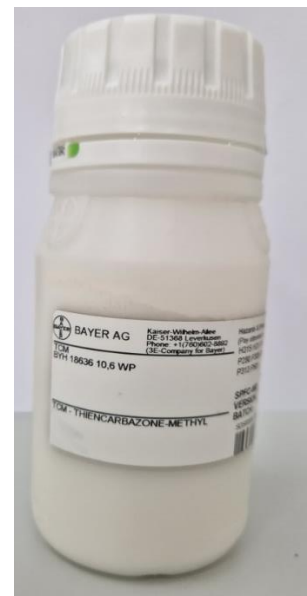
$$\% \text{ inhibicije} = [(X_c - X_t) / X_c] \times 100$$

pri čemu je X_c duljina radikule/hipokotila kontrolnih klijanaca, a X_t duljina radikule/hipokotila klijanaca tretiranih fenolnim kiselinama.

Pokus je postavljen po shemi slučajnog bloknoeg rasporeda u četiri repeticije, i ponovljen je dva puta.



Slika 3.1. Prikaz tri fenolne kiseline korištene u preliminarnom pokusu
Izvor: Veronika Nikolaš



Slika 3.2. Prikaz herbicida korištenog u pokusu na bazi tienkarbazon-metila (TKM)
Izvor: Veronika Nikolaš



Slika 3.3. Prikaz odvage na analitičkoj vagi MS105DU, Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska
Izvor: Veronika Nikolaš



Slika 3.4. Prikaz pripremanja fenolnih otopina
Izvor: Veronika Nikolaš



Slika 3.5. Prikaz dodavanja destilirane vode fenolnim kiselinama
Izvor: Veronika Nikolaš



Slika 3.6. Ultrasonična kupelj za pripremu fenolnih otopina
Izvor: Veronika Nikolaš



Slika 3.7. Sjetva sjemena i tretiranje sjemena kombinacijom fenolnih kiselina i 1/8x doze herbicida
Izvor: Veronika Nikolaš

3.4 Dose-response pokus

U dose-response pokusu, sedam linearno reduciranih doza herbicida tienkarbazon-metila ($x - 1/64 x$) te istih sedam reduciranih doza u kombinaciji s *p-kumarinskom* kiselinom (200×10^{-7} mol), primijenilo se na sjeme ambrozije na isti način kao što je opisano u preliminarnom pokusu. Doze herbicida tiakrabanzon- metila su : x , $1/2 x$, $1/4 x$, $1/8 x$, $1/16 x$, $1/32 x$ i $1/64 x$, gdje x predstavlja registriranu dozu odnosno $39,6 \text{ g ha}^{-1}$.

3.5 Statistička obrada podataka

Preliminarni i dose-response *in vitro* pokusi ponovljeni su dva puta. Dobiveni podaci (redukcija klijavosti, redukcija duljine radikule i koleoptile) obradili su se analizom varijance, a u slučaju signifikantnog F testa, za usporedbu srednjih vrijednosti koristili su se post-hoc Tukey testovi.

4. REZULTATI

4.1 Preliminarni pokus

U preliminarnom pokusu cilj je bio selektirati fenolnu kiselinu najvećeg inhibicijskog učinka na rast radikule i hipokotila ambrozije, u kombinaciji s 1/8 doze herbicida tienkarbazon-metila, s kojom će se provesti *dose-response* pokus. Odvojeno su prikazane redukcije mjerenih parametara ambrozije, obrađene u odnosu na destiliranu vodu te odvojeno, u odnosu na herbicid (Tablica 4.1.)

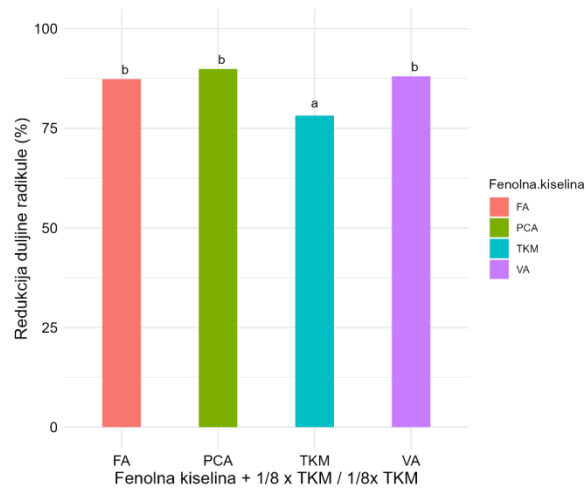
Tablica 4.1. Rezultati dvosmjerne analize varijance za redukciju duljine radikule i hipokotila ambrozije (prikazane u odnosu na destiliranu vodu i herbicid)

Izvor varijabilnosti	N-1	Destilirana voda		Herbicid	
		% redukcije			
		Duljina radikule	Duljina hipokotila	Duljina radikule	Duljina hipokotila
Fenolne kiseline (F)	2	***	*	ns	**
Doze f. kiselina (D)	2	***	**	***	***
H x D	4	ns	ns	ns	**

Oznake signifikantnosti *** =0.001 ; ** 0.01, * = 0.01, *ns - nesignifikantno

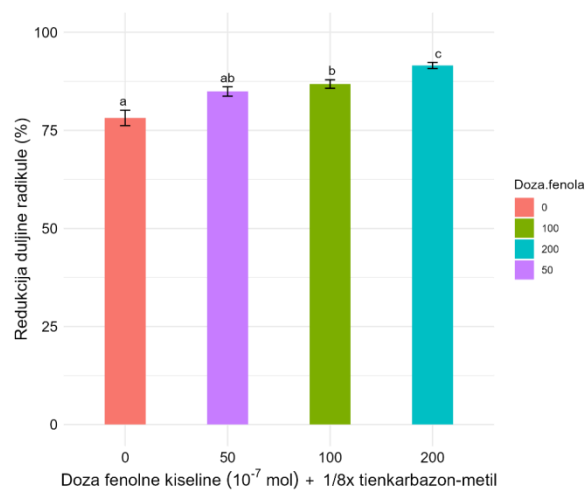
Uspoređujući duljinu radikule i hipokotila ambrozije tretirane s fenolnim kiselinama (s 1/8 x herbicida) u odnosu na destiliranu vodu, rezultati analize varijance ukazuju da je utvrđena značajna razlika u redukciji radikule i hipokotila između fenolnih kiselina, a tako i između doza fenolnih kiselina. Nasuprot tome, nije utvrđena značajna interakcija fenolne kiseline x doza fenolnih kiselina, stoga su u grafikonima 4.1 i 4.2 prikazane prosječne vrijednosti, kako za fenolne kiseline, tako i za doze fenolnih kiselina.

U grafikonu 4.1 je prikazana redukcija radikule ambrozije u ovisnosti o primijenjenoj fenolnoj kiselini s 1/8 dozom herbicida. Podaci ukazuju da dodatak fenolnih kiselina 1/8 dozi herbicida značajno jače reducira radikulu ambrozije u odnosu na čisti herbicid. Međutim, između fenolnih kiselina dodanih u 1/8 dozu herbicida nije utvrđena značajna razlika u redukciji radikule.



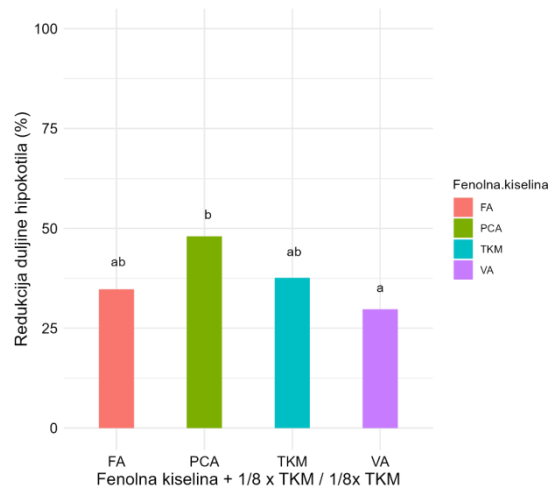
Grafikon 4.1 Redukcija duljine radikule ambrozije tretirana fenolnim kiselina s 1/8 x herbicida tienkarbazon-metila.

U grafikonu 4.2 prikazana je redukcija radikule ambrozije u ovisnosti o primijenjenoj dozi fenolnih kiselina. Značajno bolja redukcija radikule ambrozije ostvarena je primjenom najviše doze fenolnih kiselina (200×10^{-7} mol), u kombinaciji s dozom 1/8 herbicida, u odnosu na ostale doze (50 i 100×10^{-7} mol).



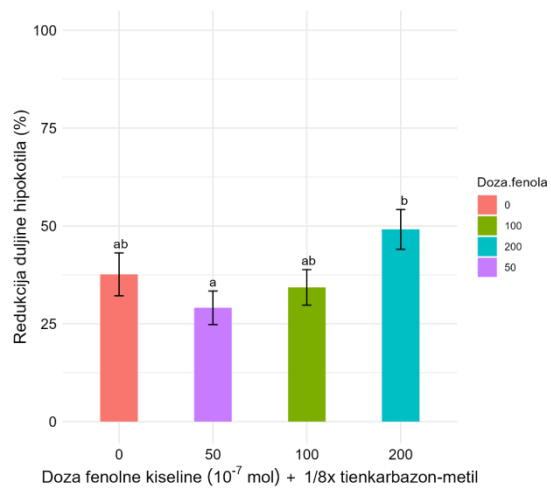
Grafikon 4.2 Redukcija duljine radikule ambrozije tretirana različitim dozama fenolnih kiselina s 1/8 x herbicida tienkarbazon-metila

U grafikonu 4.3 prikazana je redukcija hipokotila ambrozije u ovisnosti o primijenjenoj fenolnoj kiselini s 1/8 doze herbicida. Podaci ukazuju na to da dodatak fenolnih kiselina 1/8 doze herbicida značajno jače reducira radikulu ambrozije, u odnosu na čisti herbicid. Međutim, između fenolnih kiselina dodanih u 1/8 doze herbicida nije utvrđena značajna razlika u redukciji radikule. *P*-kumarinska kiselina u kombinaciji s 1/8 doze herbicida značajno je bolje reducirala duljinu hipokotila ambrozije, u odnosu na *vanilinsku* kiselinu.



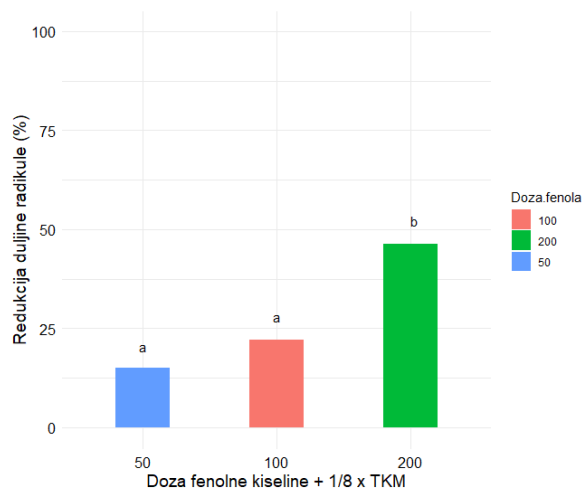
Grafikon 4.3 Redukcija duljine hipokotila ambrozije tretirana fenolnim kiselina s 1/8 x herbicida tienkarbazon-metila.

U grafikonu 4.4 prikazana je redukcija hipokotila ambrozije u ovisnosti o primijenjenoj dozi fenolne kiseline s 1/8 doze herbicida, gdje je doza od 200×10^{-7} mola ostvarila značajno bolju redukciju hipokotila u odnosu na dozu 50×10^{-7} mola.



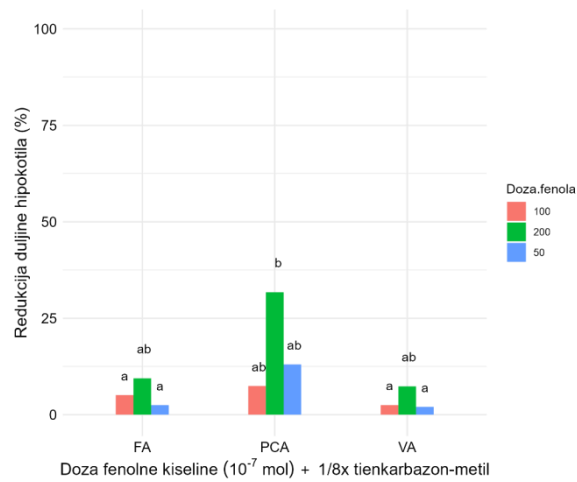
Grafikon 4.4 Redukcija duljine hipokotila ambrozije ovisno o primijenjenoj dozi fenolne kiseline s 1/8 doze herbicida tienkarbazon-metila.

Kada se podaci obrade uspoređujući učinak fenolnih kiselina s 1/8 doze herbicida, u odnosu na čisti herbicid u dozi 1/8, dvosmjerna analiza varijance ukazuje na to da je doza fenolnih kiselina od 200 x 10^{-7} mola u kombinaciji s 1/8 doze herbicida značajno bolje reducirala radikulu ambrozije, u odnosu na doze 50 i 100 x 10^{-7} mola (grafikon 4.5).



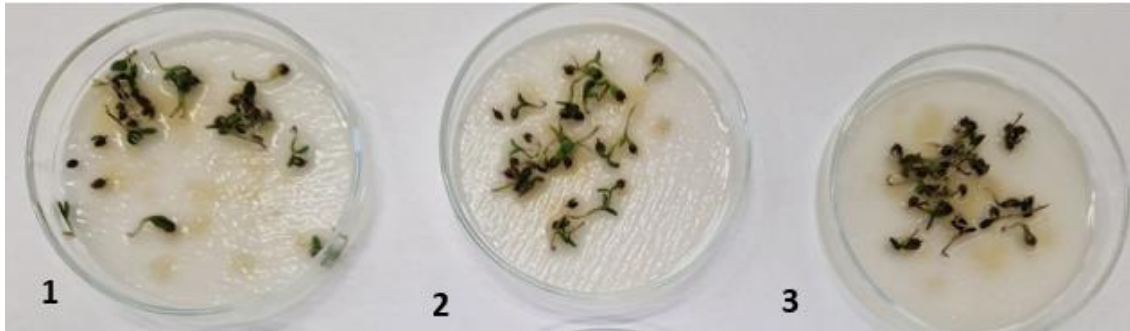
Grafikon 4.5 Prosječna redukcija duljine radikule ambrozije ovisno o dozama fenolnih kiselina kombiniranih s 1/8 doze herbicida. Podaci su prikazani kao redukcija duljine radikule ambrozije u odnosu na čisti herbicid.

U grafikonu 4.6 prikazana je redukcija hipokotila ambrozije ovisno o fenolnoj kiselini i dozi fenolnih kiselina koje su dodane u 1/8 doze herbicida, s obzirom da je utvrđena signifikantna interakcija fenolne kiseline x doze fenolne kiseline (Tablica 4.1). *P*-kumarinska kiselina u dozi od 200 x 10^{-7} mola značajno je jače reducirala duljinu hipokotila ambrozije, u odnosu na ferulinksu i vanilinsku kiselinu u dozama od 50 i 100 x 10^{-7} mola.



Grafikon 4.6 Redukcija duljine hipokotila ambrozije ovisno o dozi fenolne kiseline dodane u 1/8 doze herbicida. Podaci su prikazani kao redukcija hipokotila ambrozije u odnosu na čisti herbicid.

Na temelju rezultata preliminarnog istraživanja, odabrana je *p-kumarinska* kiselina u dozi od 200×10^{-7} mola koja se koristila u *dose-response* pokusu.



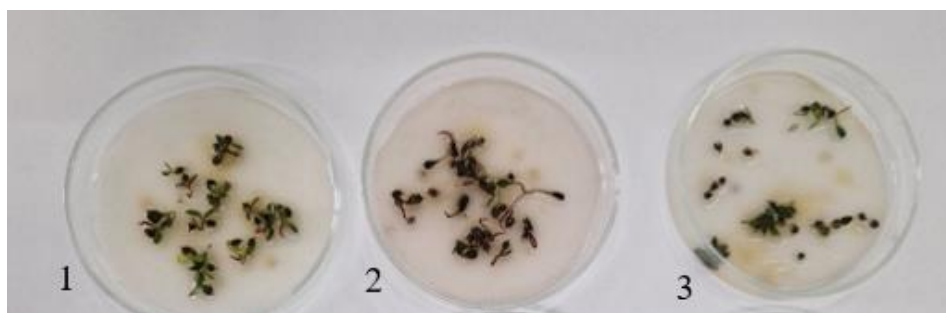
Slika 4.1.. Prikaz inhibitornog učinka *ferulinske* kiseline pri dozi 200×10^{-7} mol s TKM(1/8 x doze, repeticija 1,2,3)

Izvor: Veronika Nikolaš

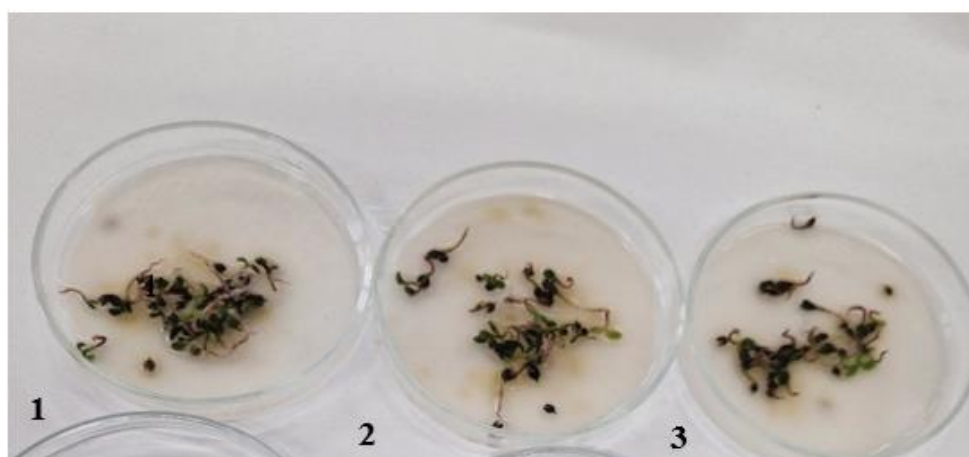


Slika 4.2. Prikaz inhibicije rasta ambrozije na kontrolnim tretmanima (1- kontrola TKM; 2- kontrola voda)- i u tretmanima *p-kumarinske* kiseline u tri doze i 1/8 x doze herbicida TKM (3-PCA 200 + TKM; 4- PCA 100 + TKM; 5- PCA 50 + TKM)

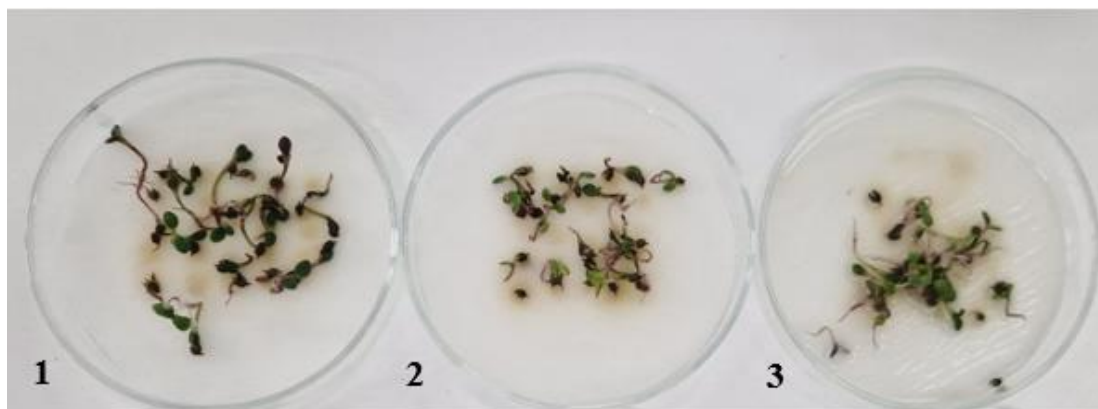
Izvor: Veronika Nikolaš



Slika 4.3. Prikaz klijanaca ambrozije u preliminarnom pokusu (kombinacija *p-kumarinske* fenolne kiseline u dozi 200×10^{-7} mol s herbicidom (TKM) repeticija 1, repeticija 2 i repeticija 3)
Izvor: Veronika Nikolaš



Slika 4.4. Prikaz klijanaca ambrozije u preliminarnom pokusu (kombinacija *p-kumarinske* fenolne kiseline u dozi 100×10^{-7} mol s herbicidom (TKM) repeticija 1, repeticija 2 i repeticija 3)
Izvor: Veronika Nikolaš



Slika 4.5. Prikaz klijanaca ambrozije u preliminarnom pokusu (kombinacija *p-kumarinske* fenolne kiseline u dozi 50×10^{-7} mol s herbicidom (TKM) repeticija 1, repeticija 2 i repeticija 3)
Izvor: Veronika Nikolaš

4.2 Dose-response pokus

Dose-response pokus postavio se na principu sedam linearno padajućih doza herbicida, te istih doza u kombinaciji s *p*-kumarinskom kiselinom u dozi 200×10^{-7} mol. U ovom pokusu provedena je dvosmjerna analiza varijance kod redukcije mjerenih parametara ambrozije u odnosu na destiliranu vodu (prvi faktor herbicidna otopina, a drugi faktor doza herbicida), te jednosmjerna analiza varijance za redukciju mjerenih parametara ambrozije u odnosu na herbicid (pozitivna kontrola).

Redukcija mjerenih parametara ambrozije prikazana u odnosu na destiliranu vodu

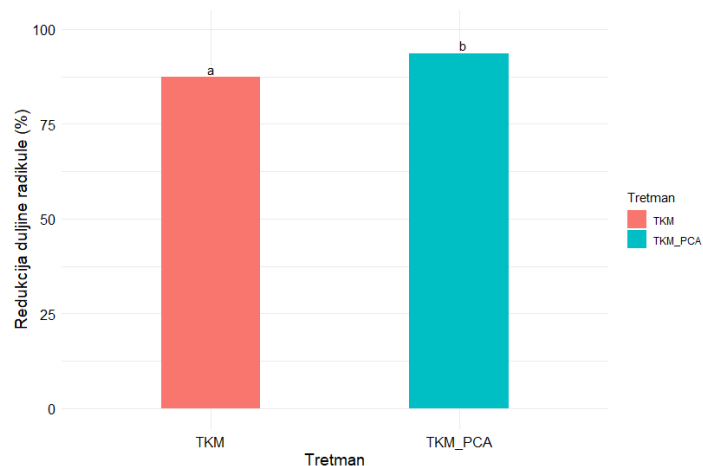
Tablica 4.2. Analiza dvosmjerne varijance za mjerene parametre ambrozije tretirane herbicidnim otopinama (s *p*-kumarinskom kiselinom i bez *p*-kumarinske kiseline)

Izvor varijabilnosti	N-1	% redukcija		
		Duljina radikule	Duljine hipokotila	Suha masa klijanaca
Herbicidne otopine (H)	1	***	ns	ns
Doza herbicida (D)	6	*	**	ns
H x D	6	Ns	**	ns

Analiza varijance ukazuje da je utvrđena izrazito značajna razlika u duljini radikule ambrozije, ovisno o tome je li tretirana s čistim herbicidom ili s herbicidom u kombinaciji s *p*-kumarinskom kiselinom. Također je utvrđena značajna razlika u duljini radikule ambrozije koja je tretirana različitim dozama herbicida. Za razliku od toga, nije utvrđena značajna interakcija između herbicidne otopine x doze herbicida.

Za navedene parametre u kojima je utvrđena značajna razlika, provedena je jednosmjerna analiza varijance. Ta je analiza pokazala značajnu razliku jedino u duljini radikule ambrozije tretirane različitim herbicidnim otopinama, dok značajna razlika u duljini ambrozije tretirane različitim dozama herbicida nije utvrđena.

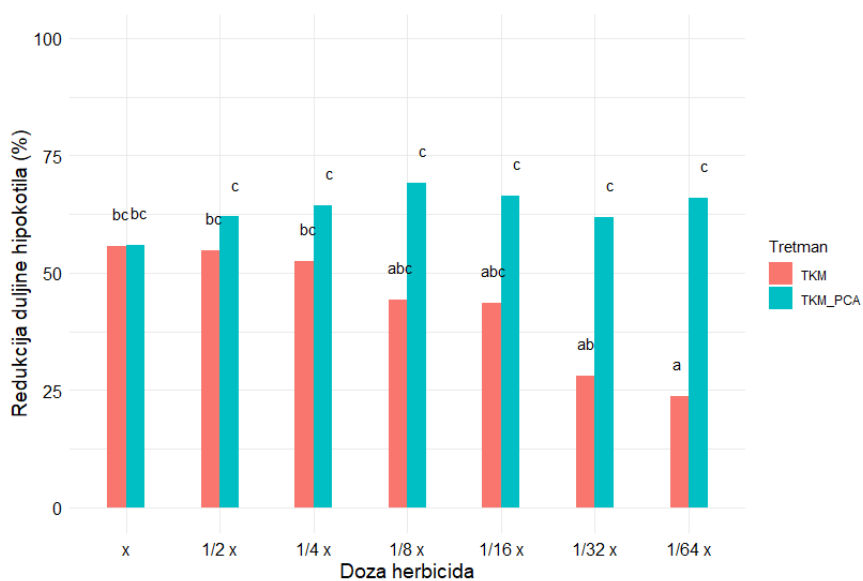
U grafikonima su, stoga, prikazane prosječne vrijednosti redukcije duljine radikule ambrozije tretirane čistim herbicidom i herbicidom u kombinaciji s *p*-kumarinskom kiselinom (grafikon 4.7).



Grafikon 4.7 Redukcija duljine radikule ambrozije tretirane herbicidnim otopinama

Iz grafikona 4.7 vidljivo je da se dodatkom *p-kumarinske* kiseline herbicidu tienkarbazonmetilu, radikula ambrozije značajno više reducirala (92,4%) u odnosu na čisti herbicid bez dodatka *p-kumarinske* kiseline (86,1%).

Uzimajući u obzir utvrđenu interakciju herbicidna otopina x doza herbicida za redukciju hipokotila ambrozije, u grafikonu 4.8 prikazane su vrijednosti redukcije hipokotila za sve herbicidne otopine i doze herbicida.



Grafikon 4.8 Redukcija hipokotila ambrozije tretirane različitim herbicidnim otopinama i dozama herbicida.

Iz grafikona je vidljivo da je samo kod najnižih dozacija herbicida (1/32 x i 1/64 x), kod primjene kombinacije herbicida i *p-kumarinske* kiseline utvrđena značajno bolja redukcija hipokotila ambrozije, u odnosu na čisti herbicid. Kod ostalih dozacija herbicida (x-1/16x) nije utvrđena značajno veća razlika u redukciji hipokotila ambrozije kada se herbicidu dodala *p-*

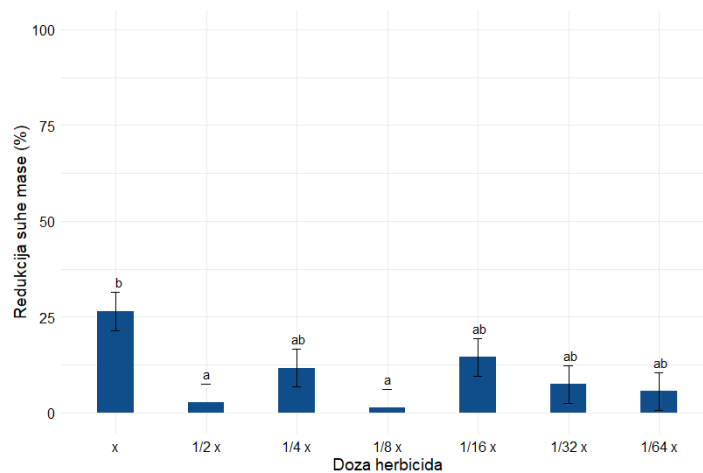
kumarinska kiselina, u odnosu na samostalnu primjenu ovog herbicida (bez *p-kumarinske* kiseline). Pri ovim dozacijama, redukcija hipokotila ambrozije kretala se od 43,3% do 69,1%, između primjene čistog herbicida i kombinacije (herbicid + *p-kumarinska* kiselina).

Redukcija mjerenih parametara ambrozije tretirane kombinacijom herbicida i *p-kumarinske* kiseline prikazane u odnosu na čisti herbicid

Tablica 4.3. Jednosmjerna analiza varijance za mjerene parametre ambrozije tretirane herbicidnim otopinama (s *p-kumarinskom* kiselinom i bez *p-kumarinske* kiseline) prikazane u odnosu na herbicid (pozitivna kontrola)

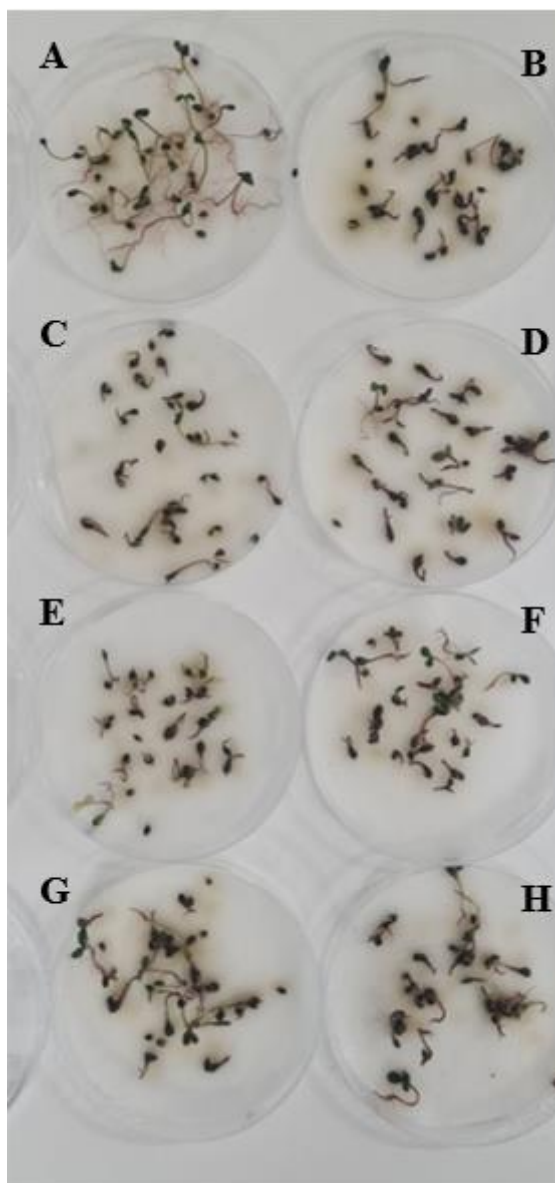
Izvor varijabilnosti	N-1	% redukcija		
		Duljina radikule	Duljine hipokotila	Suha masa klijanaca
Doze herbicida	6	ns	ns	*

Iz jedosmjerne analize varijance kod koje je redukcija mjerenih parametara ambrozije tretirane reduciranim dozama herbicida, uz dodatak *p-kumarinske* kiseline, obrađena u odnosu na čisti herbicid, vidljivo je da se dodatkom *p-kumarinske* kiseline herbicidu značajno bolje reducirala jedino suha masa klijanaca. Za razliku od toga, ni radikula ni hipokotil ambrozije nisu se jače reducirali primjenom reduciranih doza kombinacije herbicida i *p-kumarinske* kiseline, u odnosu na reducirane doze čistog herbicida.



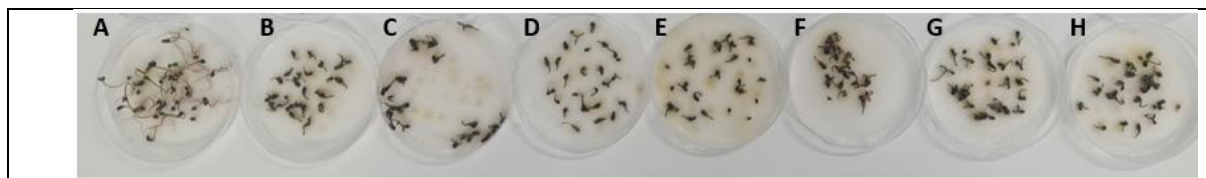
Grafikon 4.9. Redukcija suhe mase ambrozije tretirane reduciranim dozama herbicida i *p-kumarinske* kiseline

Iz grafikona 4.9. vidljivo je da se primjenom registrirane doze herbicida (x) u kombinaciji s *p-kumarinskom* kiselinom postigla oko 25% jača redukcija, u odnosu na istu dozu herbicida, ali bez primjene *p-kumarinske* kiseline. Međutim, nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na primjenu 1/4, 1/16, 1/32 te 1/64 doze ovog herbicida i *p-kumarinske* kiseline.



Slika 4.6. Prikaz klijanaca ambrozije: A- kontrolni tretman vodom; B- TKM x pune doze ; C- TKM $\frac{1}{2}$ x doze; D-TKM $\frac{1}{4}$ x doze; E- TKM $\frac{1}{8}$ x doze; F- TKM $\frac{1}{16}$ x doze; G- TKM $\frac{1}{32}$ x doze; H- TKM $\frac{1}{64}$ x doze

Izvor: Laura Pismarović



Slika 4.7. Prikaz klijanaca ambrozije: A- kontrolni tretman vodom; B-PCA 200+ TKM x pune doze ; C- PCA 200+ TKM $\frac{1}{2}$ x doze; D-PCA 200+ TKM $\frac{1}{4}$ x doze; E-PCA 200+ TKM $\frac{1}{8}$ x doze; F- PCA 200+TKM $\frac{1}{16}$ x doze; G- PCA 200+TKM $\frac{1}{32}$ x doze; H- PCA 200+ TKM $\frac{1}{64}$ x doze

Izvor: Laura Pismarović

5. RASPRAVA

Zbog sve većih pritisaka Europskog zelenog plana i Direktive o održivoj uporabi pesticida na poljoprivredu, ograničavajući su uvjeti proizvodnje zdravstveno ispravne hrane bez primjene kemijskih sredstava za zaštitu bilja. Takva ograničenja dovode do potrebe pronalaska novih mjera zaštite s povoljnijim ekotoksikološkim svojstvima. Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi klijavost i duljinu radikule ambrozije, primjenom tri doze fenolnih kiselina s reduciranim dozama herbicida tienkarbazon-metila. Na koncu, željelo se utvrditi iste parametre primjenom selektirane fenolne kiseline s reduciranim dozama herbicida (sedam linearno padajućih), kao i primjenom istih linearno padajućih doza herbicida bez fenolne kiseline.

Istraživanje o alelopatskom učinku fenolnih kiselina prema rastu i razvoju ambrozije, koje je ujedno i podloga ovoga rada, provedeno je 2021. godine (Šćepanović i sur., 2021a). Vodeni ekstrakti vrste *Camelina sativa* inhibirali su klijanje i početni rast ambrozije, a inhibitorni učinak koreliran je s prisustvom fenolnih kiselina u biljnim organima ove biljne vrste. Daljnjim istraživanjima selektirane su *vanilinska*, *ferulinska* i *p-kumarinska* kiselina, koje su u *in vitro* istraživanjima iskazale inhibirajući učinak prema ambroziji (Šćepanović i sur., 2022). Dosadašnji podaci iz literature ukazuju da fenolne kiseline imaju inhibirajući učinak i prema drugim korovnim vrstama. Tako Anwar i sur. (2023) navode da *ferulinska* i *galna* kiselina smanjuju razinu proteina i klorofila, a povećavaju razinu antioksidativnih enzima i peroksidaciju lipida u korovnim vrstama *Sinapis arvensis*, *Lolium multiflorum* i *Parthenium hysterophorus*. Također je, nakon 48h od primjene fenola, ekspresija fotosintetskog gena (*psbA*) smanjena od deset do trideset puta. *P-kumarinska* kiselina negativno djeluje na unos vode, održavanje Na/K kanala i na opskrbu kisikom koji je nužan za klijanje. Utvrđeno je također da prisustvo alelokemikalija, posebice u vidu fenolnih kiselina, inhibira klijanje sjemena ograničavanjem staničnog disanja te da utječu na propusnost membrane (Batish i sur., 2001; Gniazdowska i Bogatek, 2005; Asghari i Tewari, 2007). Stoga su se, u ovom diplomskom radu, istraživale spomenute tri fenolne kiseline u kombinaciji s reduciranim dozama herbicida tienkarbazon-metila.

Prema pregledu literature, dosad nije proučavano i istraživano tretiranje korovnih vrsta kombinacijom fenolnih kiselina i reduciranih doza herbicida. Ipak, u literaturi se navode mogućnosti primjene reduciranih doza herbicida, u ovom slučaju mezotriona s vodenim ekstraktima biljnih vrsta ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia*) i čička (*Xanthium strumarium*) na korovnu vrstu bijelu lobodu (*Chenopodium album*). Dobiveni rezultati ukazuju na to da je polovina preporučene doze herbicida mezotriona, zajedno s vodenim ekstraktima, značajno reducirala svježnu masu lobode (*C.album*) za 95%, u usporedbi s kontrolnim biljkama koje nisu bile tretirane. S druge strane, primjena čistih ekstrakata ove dvije vrste postigla je redukciju od 16 do 19% (Sarić-Krsmanović i sur., 2020.).

U ovom *in vitro* istraživanju, fenolne kiseline kombinirale su se s reduciranim dozama herbicida tienkarbazon-metila. Ovaj herbicid se u praksi koristi isključivo u kombinaciji s drugim djelatnim tvarima, a najčešće s herbicidom izoksalfutolomu u pripravku Adengo.

Nažalost, nisu pronađeni literaturni podaci o učinku samostalno primijenjenog tienkarbazon-metila na ambroziju, već samo u kombinaciji s drugim djelatnim tvarima. Tako se u dvogodišnjem poljskom istraživanju (2009. i 2010.) pokušavao utvrditi učinak kombinacije tienkarbazon-metila, izoksaflutola i atrazina za suzbijanje korova u usjevu kukuruza: *Echinochloa crus-galli*, *Ipomoea hederacea*, *Sorghum halepense*, *Amaranthus palmeri* te *Abutilon theophrasti*. Dvadeset tjedana nakon sjetve, ova je kombinacija herbicida inhibirala rast korova za 90% (Stephenson i Bond, 2012.).

Tienkarbazon-metil istraživao se i u kombinaciji s herbicidom jodosulfuron u suzbijanju divovske ambrozije (*Ambrosia trifida* L.) otporne na glifosat. Kombinacija jodosulfurona (6%) i tienkarbazona (45%) primijenjena jednokratno ili u odvojenim primjenama u jesen i rano proljeće, uspješno je inhibirala na glifosat rezistentnu divovsku ambroziju (<60%), te je gustoća iznosila 14 biljaka/m². To se moglo usporediti s kontrolnim tretmanom (25 biljaka /m²), gdje nije bila primijenjena ova kombinacija (28 dana nakon ranoproljetnog tretmana). Također, herbicidi 2,4-D ili dikamba u tank miks primjeni s tienkarbazon-metilom inhibirali su rast ambrozije ≥92%, (Kaur i Jhala, 2018). Dobar učinak tienkarbazona na ambroziju i ostale korovne vrste, razlog je učestalog korištenja ovih herbicida, a posebice u suzbijanju rezistentnih biotipova korova na herbicide drugog mehanizma djelovanja. Iako visoko učinkovit, temeljem zahtjeva Zelenog plana, ali i zbog antirezistentne strategije, potrebno je umjantiti njegov unos u okoliš. Pritom je potrebno zadržati visoki učinak na korovne vrste, što se u ovom istraživanju pokušalo napraviti dodatkom fenolnih kiselina.

Rezultati preliminarnog pokusa ukazuju da je *p-kumarinska* kiselina u dozi 200×10^{-7} mol pokazala veći inhibitorni učinak prema ambroziji (Grafikon 4.1.), u odnosu na vanilinsku i ferulinsku kiselinu. Sukladno tome, ova je kiselina kombinirana sa sedam linearno padajućih doza herbicida ($x-1/64$ x). Rezultati pokusa ukazuju na to da dodatak *p-kumarinske* kiseline tienkarbazon-metilu značajno jače reducira radikulu ambrozije, u odnosu na primjenu čistog herbicida (Grafikon 4.7.). Tako je ova kombinacija prosječno reducirala radikulu ambrozije za 92,4%, u uspoređi s čistim herbicidom (86,1%). Međutim, između istraživanih dozacija nije utvrđena značajna razlika u inhibiciji radikule ambrozije (Tablica 4.3.). Navedeni podaci ukazuju na visoku učinkovitost tienkarbazon-metila i pri vrlo niskim dozama. Ipak, rezultati pokazuju da dodatak *p-kumarinske* kiseline jako reduciranim dozama herbicida ($1/32$ i $1/64$ x) značajno bolje reducira hipokotil ambrozije, u odnosu na čisti herbicid (Grafikon 4.8.).

Ovaj efekt objašnjava se kao efekt hormoneza, odnosno visok inhibirajući učinak veoma niske doze herbicida. U literaturi nije zasada proučavan učinak samostalno primijenjenog herbicida tienkarbazon-metila, kao ni u kombinaciji s vodenim ekstraktima i fenolnim kiselinama. U ovom istraživanju, vidljivo je da se pri malim dozacijama herbicida, uz dodatak *p-kumarinske* fenolne kiseline, uspješno inhibira rast ambrozije. Sam herbicid tienkarbazon-metil ima vrlo visok inhibirajući učinak na ambroziju i mnoge druge korove, no rijetko kada se primjenjuje samostalno. Zbog izrazito visoke učinkovitosti, u ovom su se radu primjenjivale niske doze. No, ono što je bitno za njegovo uspješno djelovanje jest razvojna faza korova kada se herbicid primijeni, vrijeme aplikacije te pokrovnost lista dlačicama ili voskom. Također, bitni čimbenici za usvajanje herbicida su i okolišni uvjeti. Naime, prodor herbicida kroz list i stabljiku

odvija se brže kod relativno visoke vlage zraka, a suho i toplo vrijeme pogoduju stvaranju voštane prevlake na površini, stoga uvelike mogu djelovati na sporije usvajanje herbicida (Ostojić, 2008). Herbicid Adengo je jedan od najčešće primijenjenih herbicida u usjevima kukuruza. Prema radu Pismarović i sur. (2021), proučavan je učinak inhibicije reduciranih doza herbicida Adenga i *ferulinske*, *p-kumarinske*, *p-hidroksibenzojeve* i *vanilinske* kiseline na rast i razvoj ambrozije. Pokus je bio proveden u laboratoriju te rezultati ukazuju na to da se kod pune i polovične doze, postotak redukcije radikule nije značajno razlikovao s dodatkom fenolnih kiselina i primjenom čistog herbicida. Međutim, dodatkom fenolnih kiselina u 1/8 doze herbicida, utvrđen je značajno bolji inhibirajući učinak u odnosu na čisti herbicid. Najjača je inhibicija zabilježena kod 1/32 doze herbicida, gdje je postotak redukcije radikule iznosio 96,5%. Kod 1/16 doze herbicida, redukcija radikule iznosila je 66,9%, dok se dodatkom fenolnih kiselina taj postotak kretao od 79% (*vanilinska* kiselina VA) do 91,5% (*ferulinska* kiselina FA). Također je pri najnižoj dozi herbicida (1/128 doze) zabilježen inhibitorski učinak rasta radikule koji je iznosio od 64,5% (VA) pa do 92,4% (*p-hidroksibenzojeva* kiselina PHA). U ovom radu, postotak inhibicije hipokotila kod kombinacije 1/2 doze herbicida i *p-kumarinske* kiseline, bio je značajno bolji nego postotak inhibicije samostalno primijenjenog herbicida. Dodatak ostalih kiselina u reducirane doze herbicida nije značajno reducirao rast hipokotila, pa se *p-kumarinska* kiselina istaknula kao najučinkovitija, isto kao i u ovom diplomskom radu.

U istraživanju Pismarović i sur. (2021), istraživan je i folijaran učinak kombinacije fenolnih kiselina i herbicida Adengo u *in vivo* uvjetima. Rezultati ukazuju na to da je viša doza *p-hidroksibenzojeve* kiseline pokazala značajniji inhibitorski učinak, što opet potvrđuje rezultate i ovoga diplomskog rada gdje se najbolji učinak postigao s najvećom dozom *p-kumarinske* kiseline. Tako Pismarović i sur. (2021) navode da je pri dozama herbicida reduciranim za 1/8 i 1/16x dodatkom *p-hidroksibenzojeve* kiseline i *ferulinske* kiseline, značajno inhibiran rast nadzemne mase ambrozije. Za razliku od toga, pri jako reduciranim dozama herbicida (1/64 x i 1/128 x doze), nije zabilježen jači inhibitorski učinak dodatkom fenolnih kiselina u odnosu na čisti herbicid. To je očekivano, s obzirom na činjenicu da u *in vivo* uvjetima, učinak herbicida ovisi o biotičkim i abiotičkim čimbenicima, za razliku od *in vitro* uvjeta gdje nema barijera kod usvajanja herbicida.

Ono što je potvrđeno u radu Pismarović i sur. (2021), a potkrepljuje i rezultate ovoga rada, jest sinergistički odnos fenolnih kiselina i herbicida, što svakako predstavlja potencijalno rješenje u suzbijanju korova, uz manji utrošak kemijskih sredstava zaštite. Bitno je naglasiti da se rezultati poljskih i plasteničkih uvjeta mogu značajno razlikovati zbog različitog usvajanja herbicida u vanjskim uvjetima. U polju na sam učinak herbicida djeluju okolišni uvjeti poput temperature, vlage, oborina, vjetra te nije jednaka mogućnost usvajanja, kao što je to slučaj u idealnim uvjetima poput laboratorijskih uvjeta.

S obzirom na navedeno, fenolne kiseline se potencijalno mogu koristiti u kombinaciji s herbicidima s ciljem umanjenja unosa herbicida u okoliš. Pritom bi svakako trebalo testirati i selektivnost usjeva prema fenolnim kiselinama te kombinacijom fenolnih kiselina s herbicidima. Primjerice, u radu Krogmeiera i Bremnera (1989) istraživane su *p-kumarinska*, *ferulinska* i *vanilinska* kiselina, na rani rast i razvoj šest usjeva, u *in vitro* i *in vivo* uvjetima.

Nakon primjene ove tri fenolne kiseline, klijavost sjemena lucerne bila je smanjena za 27%, dok sjeme kukuruza nije pokazalo značajan fitotoksični učinak. Kada su se fenolne kiseline primijenile u *in vivo* uvjetima, nije zamijećena inhibicija lucerne. Bez obzira što kukuruz nije pokazao značajnu fitotoksičnost nakon tretiranja bilo kojom od ispitanih fenolnih kiselina, ne može se zaključiti odgovara li svaki hibrid jednako na djelovanje fenolne kiseline, što bi označilo svojevrsnu „hibridnu otpornost“ (Janovicek i sur.,2011).

Iako rezultati istraživanja ukazuju na to da fenolne kiseline poboljšavaju učinak herbicida, negativne karakteristike nekemijskih mjera suzbijanja korova su skupoća proizvoda, nestabilnost (fotolabilnost, termolabilnost), težina primjene i dr. U istraživanju Li i sur. (2015), proučavana je stabilnost fenolnih kiselina i njihov učinak na suzbijanje korova. Stabilnost uvelike ovisi o pH, temperaturi, svjetlu i mnogim abiotičkim i biotičkim čimbenicima. Utvrđeno je da je kroz prvih 48 sati, koncentracija fenolnih kiselina bila na visokoj razini, dok se nakon tog vremenskog perioda koncentracija naglo smanjila. Nakon sedmoga dana, koncentracija se smanjila za 70%, što ukazuje na to da fenolne kiseline samostalno nemaju dugu perzistentnu moć. Opadanjem koncentracije fenolne kiseline s vremenskim odmakom od primjene, opada i inhibitorni učinak na klijanje i rast korovnih biljaka. Podataka o perzistentnosti fenolnih kiselina u zajedničkoj primjeni s herbicidima nema u literaturi, pa bi to svakako trebalo istraživati u narednim pokusima.

Također, potrebno je istražiti i kombinaciju nekoliko fenolnih kiselina, kao i njihov potencijalni sinergistički učinak. Primjerice, utvrđen je sinergistički fitotoksični učinak u kombinaciji *p*-kumarinske i ferulinske kiseline. Mješavine koje su sadržavale 5×10^{-3} M *p*-kumarinske i 5×10^{-3} M ferulinske kiseline inhibirale su klijavost za 34% u odnosu na kontrolni tretman nakon 24 sata, i 59% nakon 48 sati. Fitotoksični učinak ove kombinacije dvije fenolne kiseline bio je približan inhibitornom učinku, kao i s većom dozom istih kiselina (10^{-2} M). Tretman s ekvimolarnom mješavinom $2,5 \times 10^{-4}$ M *p*-kumarinske i $2,5 \times 10^{-4}$ M ferulinske kiseline smanjio je suhu masu klijanaca znatno ispod mase klijanaca tretiranih odvojeno s $2,5 \times 10^{-4}$ M *p*-kumarinske ili ferulinske kiseline. Razrjeđenja koja su slijedila, pokazala su da je koncentracija od $1,25 \times 10^{-4}$ M bilo koje fenolne kiseline stimulirala rast klijanaca, dok je mješavina ove dvije fenolne kiseline inhibirala rast klijanaca (Rasmussen i Einhellig, 1977).

Fenolne kiseline prema pokazanim djelovanjem na rast klijanaca ambrozije pokazuju pozitivna alelopatska svojstva, te svakako predstavljaju potencijalne nove nekemijske mjere suzbijanja, u iscrpnoj i dugotrajnoj borbi suzbijanja korova uz sve manje dostupnih kemijskih sredstava. Učinkovitost fenolnih kiselina ovisi o njihovoj dozi, ali i o herbicidu s kojim se kombiniraju, kao i o dozi herbicida. Ono što je bitno za utvrditi prije primjene jest osjetljivost usjeva na djelovanje fenolne kiseline, te rezistentnost samih korova. Prema literaturi, fenolne kiseline pokazuju bolju učinkovitost u kombinaciji s herbicidima negoli u samostalnoj primjeni (Razzaq i sur., 2012; Sarić- Krsmanović i sur., 2020). Ono što je zasad dokazano i istraženo jest to da se alelopatske interakcije istražuju primjenom vodenih ekstrakata osušenih biljnih dijelova, u kojima su mješavine fenolnih i drugih biološki aktivnih spojeva (Farooq i sur., 2011). U takvim interakcijama, alelokemikalije najčešće imaju bolji inhibicijski potencijal kada se primjenjuju u kombinacijama s drugim fenolnim kiselinama.

Fenolne kiseline i njihova alelopatska učinkovitost svakako predstavljaju budućnost, te postoje temelji za detaljnija istraživanja i utvrđivanja njihove učinkovitosti u plasteničkim pokusima – ali, još važnije, i učinkovitosti u poljskim pokusima. Upravo bi primjena ovih mjera bila rješenje trenutno važnih problema invazije pojedinih vrsta, kao što je *Ambrosia artemisiifolia* L., te njihove rezistentnosti na herbicide.

6. ZAKLJUČAK

Nakon provedenoga *in vitro* pokusa o djelovanju fenolnih kiselina (*p-kumarinska*, *ferulinska* i *vanilinska*) u kombinaciji s reduciranim dozama herbicida, može se zaključiti sljedeće:

1. Klijavost i početni rast ambrozije (duljina radikule, hipokotila i masa klijanaca) bila je inhibirana kad su se u otopine 1/8 doze herbicida tienkarbazon-metila dodale *p-kumarinska*, *ferulinska* i *vanilinska kiselina*. *P-kumarinska* kiselina u dozi 200×10^{-7} mol, u kombinaciji s 1/8 doze herbicida, ostvarila je najjači inhibitorni učinak na ambroziju te se koristila u *dose-reponse* pokusu sa sedam linearno padajućim dozama herbicida ($x - 1/64x$).
2. Dodatkom *p-kumarinske* kiseline reduciranim dozama herbicida, radikula ambrozije značajno se jače reducirala (92,4%), u odnosu na herbicid bez dodatka *p-kumarinske* kiseline (86,1%).
3. Kod najnižih dozacija herbicida (1/32 x i 1/64 x), utvrđena je značajno bolja redukcija hipokotila ambrozije, kod primjene kombinacije herbicida i *p-kumarinske kiseline*, u odnosu na sam herbicid. Kod ostalih dozacija herbicida ($x-1/16x$), nije utvrđena značajna veća razlika u redukciji hipokotila ambrozije kada se herbicidu dodala *p-kumarinska* kiselina, u odnosu na samostalnu primjenu ovog herbicida (bez *p-kumarinske* kiseline). Pri ovim dozacijama, redukcija hipokotila ambrozije kretala se od 43,3% do 69,1% između primjene herbicida samog i kombinacije (herbicid + *p-kumarinska* kiselina).
4. Istraživanje je potrebno nastaviti i u poljskim uvjetima, kako bi se utvrdio učinak reduciranih doza herbicida u kombinaciji s fenolnim kiselinama, posebice pri različitim pedoklimatskim uvjetima te različitim razvojnim fazama ambrozije.

7. LITERATURA:

1. Afonin A.N., Luneva N.N., Fedorova Y.A., Kletchkovskiy E., Chebanovskaya A.F. (2018). History of introduction and distribution of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in the European part of the Russian Federation and in the Ukraine. *EPPO Bull.* 48, 266–273.
2. Almaghrabi O.A.(2012). Control of wild oat (*Avena fatua*) using some phenolic compounds I—Germination and some growth parameters. *Saudi J. Biol. Sci.* 2012;19:17–24. doi: 10.1016/j.sjbs.2011.07.005.
3. Anwar S, Naseem S, Ali Z (2023). Biochemical analysis, photosynthetic gene (psbA) down-regulation, and *in silico* receptor prediction in weeds in response to exogenous application of phenolic acids and their analogs. *PLoS ONE* 18(3):e0277146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277146>
4. Asghari J., Tewari JP.(2007). Allelopathic potentials of eight barley cultivars on *Brassica jucea* (L) Czern. And *Setaria viridis* (L) p. Beauv. *J Agric Sci Technol.* 9: 165–176. Available: <http://jast.modares.ac.ir/article-23-5481-en.html>
5. Barić K. (2024)._Herbicidi: U: Glasilo biljne zaštite 1-2/2024. 272-287.
6. Barić, K., Ostojić, Z., (2020). Implementacija pokrovnih usjeva u sustav suzbijanja korova. *Glasilo biljne zaštite*, Vol. 20, 5: 530-539.
7. Barić K., Ostojić Z., Brzoja D. (2024). Analiza potrošnje herbicida u Hrvatskoj - usporedba s potrošnjom u zemljama EU // *Glasilo biljne zaštite*, XXIV, 1/2. 2024. str. 11-11
8. Baskin J.M., Baskin C.C.(1987). Temperature requirements for after ripening in buried seeds of four summer annual weeds. *Weed Res.* 27, 385–389.
9. Batish DR., Singh HP., Kohli RK., Kaur S.(2001). Crop allelopathy and its role in ecological agriculture. *Journal of Crop Production*. Taylor & Francis Group; 2001. pp. 121–161. https://doi.org/10.1300/J144v04n02_03
10. Behrendt H., Ring J.(2012). Climate Change, Environment and Allergy. *Chem. Immunol. Allergy* . 96, 7–14.
11. Béres I. (1981). A Parlagfű (*Ambrosia elatior* L.) Hazai Elterjedése, Biológija és a Védekezés Lehetőségei. Candidate's Thesis, Agricultural University, Keszthely, Hungary.
12. Béres I., Bíró K. (1993). A parlagfű (*Ambrosia elatior* L.) élelciklusa és fenofázisának időtartama. *Növényvédelem* . 29, 148–151.
13. Béres I., Hunyadi K. (1984). Dormancy and germination of common ragweed (*Ambrosia elatior* L.) seeds in the field in Hungary. *Acta Agron. Acad. Sci. Hung.* 33, 383–387.
14. Béres I., Hunyadi K.(1980). A parlagfű (*Ambrosia elatior* L.) biológija. *Növényvédelem* . 16, 109–116.
15. Béres I, Kazinczi G., Kiss L., Novák R. (2007). Distribution and harmful effect of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) in Hungary. *European Weed Research Society. 14 th EWRS Symposium*. 17 – 21 June 2007. Hamar, Norway. p.13.

16. Brijačak E., Koščak L., Šoštarić V., Kljak K., Šćepanović M. (2020). Sensitivity of yellow foxtail (*Setaria glauca* L.) and barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L.) to aqueous extracts or dry biomass of cover crops. *J. Sci. Food Agric.* 2020;100:5510–5517. doi: 10.1002/jsfa.10603.
17. Case M.J., Stinson K.A.(2018). Climate change impacts on the distribution of the allergenic plant, common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) in the eastern United States. *PLoS ONE* . 13, e0205677.
18. Chauvel B., Dessaint F., Cardinal-Legrand C., Bretagnolle F. (2006). The historical spread of *Ambrosia artemisiifolia* L. in France. *Herb. Rec. J. Biogeogr.* 2006. 33, 665–673.
19. Chen L., Li J., Zhu Y., Guo L., Ji R., Miao Y., Guo L., Du H., Liu D. (2022) .Caffeic Acid, an Allelochemical in *Artemisia argyi*, Inhibits Weed Growth via Suppression of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway and the Biosynthesis of Gibberellin and Phytoalexin. *Front. Plant Sci.* 12:802198. doi: 10.3389/fpls.2021.802198
20. Chikoye D., Weise S.F., Swanton C.J.(1995). Influence of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) time of emergence and density on white bean (*Phaseolus vulgaris*). *Weed Sci.* 43, 375–380.
21. Csontos P., Vitalos M., Barina Z., Kiss L.(2010). Early distribution and spread of *Ambrosia artemisiifolia* in Central and Eastern Europe. *Bot. Helv.*120, 75–78.
22. Dickerson C.T.(1968). Studies on the Germination, Growth, Development and Control of Common Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.). Ph.D. Thesis, Cornell University, Ithaca, NY, USA, 1968.
23. Einhellig F.A. (2004).Mode of Allelochemical Action of Phenolic Compounds. In: Galindo J.C.G., Molinillo J.M.G., Cutler H.G., editors. *Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals*. CRC Press LLC; Boca Raton, FL, USA: 2004. pp. 217–238.
24. El Kelish A., Zhao F., Heller W., Durner J., Winkler J.B., Behrendt H., Traidl-Hoffmann T., Horres R., Pfeifer M., Frank U. et al.(2014). Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen allergenicity: SuperSAGE transcriptomic analysis upon elevated CO₂ and drought stress. *BMC Plant Biol.*14, 176.
25. Essl F., Biró K., Brandes D., Broennimann O., Bullock J.M., Chapman D.S., Chauvel B., Dullinger S., Fumanal B., Guisan A., et al.(2015). Biological Flora of the British Isles: *Ambrosia artemisiifolia*. *J. Ecol.* 2015, 103, 1069–1098.
26. European Commission (2019). *European Green Deal*. European Commission; Maastricht, The Netherlands: 2019.
27. Fitosanitarni informacijski sustav (FIS) (2024). Tražilica registriranih sredstava za zaštitu bilja. <https://fis.mps.hr/fis/javna-trazilica-szb/pregled/868> (pristupljeno: 6.8.2024.)

28. Farooq M., Jabran K., Cheema Z. A., Wahid A., Siddique K. H. (2011). The role of allelopathy in agricultural pest management. *Pest Management Science*, 67(5), 493–506. <https://doi.org/10.1002/PS.2091>
29. Fumanal B., Girod C., Fried G., Bretagnolle F., Chauvel B.(2008). Can the large ecological amplitude of *Ambrosia artemisiifolia* explain its invasive success in France? *Weed Res.*48, 349–359.
30. Galzina N., Barić K., Šćepanović M., Goršić M., Ostojić Z.(2010). Distribution of Invasive Weed *Ambrosia artemisiifolia* L. in Croatia. *Agric. Conspec. Sci.* 75:75–81.
31. Genton B.J., Shykoff J.A., Giraud T.(2005). High genetic diversity in French invasive populations of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, as a result of multiple sources of introduction. *Mol. Ecol.* 14, 4275–4285.
32. Gniazdowska A., Bogatek R. (2005). Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. *Acta Physiol Plant.*27: 395–407.
33. Guillemain J.-P., Chauvel B.(2011). Effects of the seed weight and burial depth on the seed behavior of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*). *Weed Biol. Manag.* 11, 217–223.
34. Hall R.M.,Urban B., Wagentristl, H., Karrer G., Winter A., Czerny, R., Kaul H.-P.(2021). Common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) Causes Severe Yield Losses in Soybean and Impairs *Bradyrhizobium japonicum* Infection. *Agronomy* . 11, 1616.
35. Haramoto E.R., Gallandt E.R.(2005). Brassica cover cropping: I. Effects on weed and crop establishment. *Weed Sci.* 2005;53:695–701. doi: 10.1614/WS-04-162R.1
36. Heidarzade A., Pirdashti H., Esmaili M.A., Asghari J.(2012). Inhibitory activity of allelochemicals on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L.) seed and seedling parameters. *World Appl. Sci. J.* 2012;17:1535–1540.
37. Herbicide resistance action committee (HRAC) (2024). Global herbicide classification lookup. Inhibition of acetolactate synthase; Group 2. <https://hracglobal.com/tools/classification-lookup/?s=&mode=12111&letter=12137&number=12164#classificationLookup>
38. Heap, I. (2024). International herbicide-resistant weed database . Herbicide Resistant Common Ragweed Globally (*Ambrosia artemisiifolia*) <https://www.weedscience.org/Pages/Species.aspx> (pristupljeno: 28.7.2024.)
39. Janovicek KJ., Vyn TJ., Voroney RP., Allen OB.(2011). Odgovor rasta klijanaca ranog kukuruza na fenolne kiseline. *Limnka. J. Plant Sci.* 77 (3), 391-393. <https://doi.org/10.4141/P96-123>
40. Kaur S., Jhala A.J. (2018). Control of glyphosate-resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida* L.) with premix of iodosulfuron/thiencarbazone applied alone or in tank mixtures in no-till corn (*Zea mays* L.). *Canadian Journal of Plant Science.* 98(4): 908-917. <https://doi.org/10.1139/cjps-2016-0169>
41. Kazinczi G., Béres I., Novák R., Bíró K., Pathy Z.(2008). Common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*): A review with special regards to the results in Hungary. I. Taxonomy,

- origin and distribution, morphology, life cycle and reproduction strategy. *Herbologia* 2008, 9, 55–91.
42. Kazinczi G., Béres, I., Novák R., Karmán J.(2009). Újra fókuszban az ürömlevelű parlagfű. *Növényvédelem* 2009, 45, 389–403.
 43. Kazinczi G., Novák R. (2012). *Integrated Methods for the Control of Ragweed; Gyommentes Környezetét Alapítvány: Budapest, Hungary, 2012; pp. 30–98.*
 44. Keszthelyi S., Kazinczi G., Somfalvi-Tóth K.(2022). Geographical dispersion of ragweed leaf beetle (*Ophraella communa*) based on climatic and biological characters in the Palearctic habitats. *Agric. For. Entomol.*25, 165–185.
 45. Knolmayer B., Jócsák I., Taller J., Keszthelyi S., Kazinczi G. (2024). Common Ragweed—*Ambrosia artemisiifolia* L.: A Review with Special Regards to the Latest Results in Biology and Ecology. MDPI. *Agronomy* 2024, 14(3), 497.
 46. Krogmeier MJ., Bremner JM.(1989). Učinci fenolnih kiselina na klijavost sjemena i rast sadnica u tlu. *Biol Fert tla* .8 , 116–122. <https://doi.org/10.1007/BF00257754>
 47. Lehoczky É., Kerekes B., Szabó R., Busznyák J., Gólya G. (2011). Study on the biomass and seed production of ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) on winter wheat stubble. *Növénytermelés* .60, 57–60, (In Hungarian with an English summary).
 48. Li J., Zhang Q., Hu W. ,Yang X., He H.(2015). Stability of phenolic acids and the effect on weed control activity. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 58, 919–926. <https://doi.org/10.1007/s13765-015-0124-9>.
 49. Li Z.H., Wang Q., Ruan X., Pan C.D., Jiang D.A.(2010). Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*. 2010;15:8933–8952. doi: 10.3390/molecules15128933.
 50. Loddo D., Scarabel L., Sattin M., Pederzoli A., Morsiani C., Canestrone R., Tommasini M. G. (2019). Combination of Herbicide Band Application and Inter-Row Cultivation Provides Sustainable Weed Control in Maize. *Agronomy* 2020, Vol. 10, Page 20, 10(1), 20. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY10010020>
 51. Lommen S.T.E., Hallmann C.A., Jongejans E., Chauvel B., Leitsch-Vitalos M., Aleksanyan A., Tóth P., Preda C., Šćepanović M., Onen H., et al.(2018). Explaining variability in the production of seed and allergenic pollen by invasive *Ambrosia artemisiifolia* across Europe. *Biol. Invasions*.20:1475–1491. doi: 10.1007/s10530-017-1640-9.
 52. Magyar L.(2023). *A Gyommagvak Terjedése; Universitias-Győr Nonprofit Kft.: Győr, Hungary,pp. 282–364.*
 53. Makra L., Matyasovszky I., Hufnagel L., Tusnády G. (2015). The history of ragweed in the world. *Appl. Ecol. Environmental Res.* 2015, 13, 489–500.
 54. Mátyás K.K., Bódis J., Virág E., Taller J., Pintér C.(2020). Az ürömlevelű parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia* L.) virágzatának részletes leírása sztereomikroszkópos rétegfotózás használatával. *Bot. Közlemények* .107, 103–109.
 55. Oberdorfer E.(2021). *Pflanzensoziologische Exkursionsflora für Deutschland und angrenzende Gebiete*, 8th ed.; Eugen Ulmer: Stuttgart, Germany. p. 1051.

56. Ostojić Z. (2008). Čimbenici koji utječu na učinak herbicida. *Gospodarski list*, 166, 22; 51-51.
57. Pardo- Muas M., G.Puig C., Souto X.C., Pedrol N. (2020). Water-soluble phenolic acids and flavonoids involved in the bioherbicidal potential of *Ulex europaeus* and *Cytisus scoparius*. *South African Journal of Botany*. Vol. 133. 201-211.
58. Pismarović L., Šoštarčić V., Kljak K., Šćepanović M. (2021). Effect of combining reduced doses of herbicides with phenolic acids to reduce germination and growth *Ambrosia artemisiifolia* L. // 4. hrvatski simpozij o invazivnim vrstama: zbornik sažetaka / Sven D. Jelaska (ur.). Zagreb: Hrvatsko ekološko društvo, 2021. str. 26-26
59. Rasmussen J.A., Einhellig F.A. (1977). Synergistic inhibitory effects of *p*-coumaric and ferulic acids on germination and growth of grain sorghum. *J Chem Ecol* **3**, 197–205 . <https://doi.org/10.1007/BF00994146>
60. Razzaq A., Cheema ZA., Jabran, K., Hussain M., Farooq M., Zafar M. (2012). Smanjene doze herbicida korištene zajedno s alelopatskim vodenim ekstraktima sirka i suncokreta za kontrolu korova u pšenici. *J. Plant Prot. Res.* **52** (2), 281-285. <https://doi.org/10.2478/v10045-012-0045-0>
61. Reigosa M., Souto X. , Gonz´lez L. (1999). Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. *Plant Growth Regulation* **28**, 83–88. <https://doi.org/10.1023/A:1006269716762>
62. Sang W., Liu X., Axmacher J.C. (2011). Germination and emergence of *Ambrosia artemisiifolia* L. under changing environmental conditions in China. *Plant Species Biol.* **26**, 125–133.
63. Sarić- Krsmanović M., Radivojević LJ., Šantrić LR., Đorđević TM., Gajić Umiljendić J. (2020). Učinci mješavina vodenih ekstrakata alelopatskih biljaka i herbicida na suzbijanje korova. *J. Okolina. Sci. Zdravlje—B Pestic . Hrana Contam . Agric. Otpad .* **56** (1), 16–22.
64. Scavo A., Abbate C., Mauromicale G. (2019). Plant allelochemicals: Agronomic, nutritional and ecological relevance in the soil system. *Plant Soil.* 2019;442:23–48. doi: 10.1007/s11104-019-04190-y.
65. Scavo A., Mauromicale G. (2020). Integrated Weed Management in Herbaceous Field Crops. *Agronomy.* 10:466. doi: 10.3390/agronomy10040466.
66. Shrestha A., Roman E.S., Thomas A.G., Swanton C.J. (1999). Modeling germination and shoot-radicle elongation of *Ambrosia artemisiifolia*. *Weed Sci.* **47**, 557–562.
67. Silc U. (2002). Odontito-Ambrosietum Jarolimek et al. 1997—A ruderal association new to Slovenia. *Acta Bot. Croat.* **61**, 179–198.
68. Stephenson DO., Bond JA. (2012). Evaluation of Thiencarbazone-methyl- and Isoxaflutole-Based Herbicide Programs in Corn. *Weed Technology.* **26**(1):37-42. doi:10.1614/WT-D-11-00053.1

69. Stinson K.A., Wheeler J.A., Record S., Jennings J.L. (2018). Regional variation in timing, duration, and production of flowers by allergenic ragweed. *Plant Ecol.* 219, 1081–1092
70. Stupnicka-Rodzynekiewicz E., Dabkowska T., Stoklosa A., Hura T., Dubert F., Lepiarczyk A. (2006). The effect of selected phenolic compounds on the initial growth of four weed species. *J. Plant Dis. Prot.* 2006;20:479–486.
71. Sun Y., Ding J., Siemann E., Keller S.P. (2020). Biocontrol of invasive weeds under climate change: Progress, challenges and management implications. *Curr. Opin. Insect Sci.* 38, 72–78.
72. Szigetvári C., Benkő Z.R. (2004). *Biológiai Inváziók Magyarországon. Őzönnövények*; TermészetBÚVÁR Alapítvány Kiadó: Budapest, Hungary, pp. 337–371.
73. Šćepanović M., Sarić-Krsmanović M., Šoštarčić V., Brijačak E., Lakić J., Špirović Trifunović B., Gajić Umiljendić J., Radivojević L. (2021a). Inhibitory effects of *Brassicaceae* cover crop on *Ambrosia artemisiifolia* germination and early growth. *Plants.* 10(4).794. doi: 10.3390/plants10040794.
74. Šćepanović M., Šoštarčić V., Lakić J., Pintar A., Barić K. (2021b). Prvo izvješće o procjeni rezistentnosti ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia* L.) na ALS herbicide foramsulfuron, prosulfuron, tifensulfuron i imazamoks u Republici Hrvatskoj; Proceedings of the 11th Weed Science Congress and Symposium on Herbicides and Growth Regulators; Palić, Serbia. 20–23 September 2021.
75. Šćepanović M., Šoštarčić V., Pintar A., Lakić J., Barić K. (2020). Pojava rezistentnih populacija korova na herbicide inhibitore acetolaktat-sintaze u Republici Hrvatskoj. *Glasiló biljne zaštite*, 20 (6), 628-640. <https://hrcak.srce.hr/246946>
76. Šćepanović M., Koščak L., Šoštarčić V., Pismarović L., Milanović-Litre A., Kljak K. (2022). Selected Phenolic Acids Inhibit the Initial Growth of *Ambrosia artemisiifolia* L. *Biology* . 11(4), 482.
77. Šćepanović M., Šoštarčić V. i Pismarović L. (2023). Alelokemikalije pokrovnih kultura – potencijalni bioherbicidi. *Glasiló biljne zaštite*, 23 (4), 444-450. <https://hrcak.srce.hr/309304>
78. Šoštarčić, V., Masin, R., Turčinov, M., Carin, N., Šćepanović, M. (2020). Morfološka i funkcionalna intrapopulacijska varijabilnost sjemena korovnevrste *Ambrosia*. *Journal of Central European Agriculture*, 21(2), 366–378.
79. Varga P., Kazinczi G., Béres, I., Kovács, I. (2006). Competition between sunflower and *Ambrosia artemisiifolia* in additive experiments. In Proceedings of the V, Alps-Adria Scientific Workshop, Opatija, Croatia, 4 December 2006.