

Metodik för resistenstest i renkavle

– En studie om herbicidresistens; mekanismer, detektion och åtgärder

Methodology of resistance testing in black-grass

– A study of herbicide resistance; mechanisms, detection and management

Ida Petersson



Metodik för resistenstest i renkavle

Methodology of resistance testing in black-grass

Ida Petersson

Handledare:

Liv Åkerblom-Espeby, SLU, Institutionen för växtproduktionsekologi

Examinator:

Lars Andersson, SLU, Institutionen för växtproduktionsekologi

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grund, G2E, biologi

Kurstitel: Självständigt arbete i biologi – kandidatarbete

Kurskod: EX0689

Program/utbildning: Agronomprogrammet Mark/Växt

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2011

Omslagsbild: *Alopecurus myosuroides*, foto av Pierre-Yves Régnier,
<http://www.flickr.com/photos/pyregnier/3575393701/>

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Herbicidresistens, renkavle, *Alopecurus myosuroides*, ogräs, resistenstest, frötest, snabbtest, odlingsåtgärder, mekanismer, target site, metabolisk, fenoxaprop-P, cykloxidim, sulfometuron, pendimetalin



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för naturresurser och lantbruksvetenskap (NL)
Institutionen för växtproduktionsekologi

ABSTRACT

Herbicide resistance is the result of an evolutionary process where a population gradually changes from being susceptible to being resistant to an herbicide. The resistance mechanism is usually a change in the biochemistry of the weed, but in some cases changes in morphology or growth rhythm. The change is caused by random mutations. Two resistance mechanisms are found in black-grass; target site resistance and metabolic resistance.

Black-grass is a tufty, winter annual grass weed, which is mainly found in milder climates. Black-grass is a big problem in Southern Europe. In Sweden, it has its main extension in Skåne, Öland and Gotland.

Herbicide resistance is increasing on a global level, especially in farming systems that strongly rely on chemical spraying. Four major factors affecting the build up of resistance are; length of life cycle, spreading, methods of weed control and also the seed bank in the soil. Integrated weed management is required for long-term control of black-grass. A varied chemical spraying should be complemented by other methods, e.g. in crop rotation and tillage methods, increased mechanical methods, clean machines etc. It's important to alternate between different modes of action, since one reason for increased resistance is that the same herbicide or a few modes of action recurs frequently.

There are several methods for testing herbicide resistance. This thesis includes a germination test in petri dishes. Four herbicide from different herbicide groups are tested in seven populations of black-grass, from three different countries. The experiment is a part of a comparative study between laboratories in several Nordic and Baltic countries. The evaluation of the test includes three methods; visual assessment of the coverage, frequency of the number of shoots over 1 cm and a dry matter test. The herbicides are; fenoxaprop-P (in the herbicide Event Super), cycloxydim (Focus Ultra), sulfometuron (Oust) and pendimethalin (Stomp).

The result matched with the expected resistance level for some of the populations and herbicides, but not for all. This may be due to experimental mistakes. A repeating of the test would be optimal, to secure more accurate conclusions about the robustness of the test.

Through this work I have come to the conclusion that it's difficult to find a robust and fast method to detect metabolic resistance. Seed tests to detect target site resistance are often good, but as metabolic resistance usually occurs later in plant development, dose-response-tests in pots are preferred.

SAMMANFATTNING

Herbicidresistens är resultatet av en evolutionär process där en population gradvis ändras från att vara mottaglig för en herbicid till att bli motståndskraftig. Resistensmekanismen består oftast i en förändring av biokemin hos ogräset, men i vissa fall av ändrad morfologi eller utvecklingsrytm. Förändringen orsakas av slumpmässiga mutationer. Hos ogräset renkavle är två resistensmekanismer konstaterade; target site-resistens och metabolisk resistens.

Renkavle är ett tuvbildande, vinterannuellt gräsogräs som främst finns i mildare klimatområden. Renkavle är ett stort problem söderut i Europa. I Sverige har den sin främsta utbredning i Skåne, på Öland och Gotland.

Globalt sett ökar herbicidresistens, särskilt i jordbrukssystem som starkt förlitar sig på kemisk ogräsbekämpning. Fyra viktiga faktorer som påverkar resistensuppbyggnad är; längden på livscykeln, spridning av ogräset, metoder för ogräskontroll, samt fröbanken i marken. Integrerad bekämpning krävs för att långsiktigt kontrollera renkavle. Varierad kemisk bekämpning bör kompletteras med andra åtgärder, t.ex. i växtföljd och jordbearbetningsmetod, ökad mekanisk bekämpning, noggrann rengöring av maskiner etc. Viktigt är att alternera mellan olika verkningsmekanismer vid den kemiska bekämpningen, eftersom en orsak till ökad resistens är att samma eller ett fåtal verkningsmekanismer ofta återkommer.

Det finns ett flertal metoder för testning av herbicidresistens. I detta arbete görs ett gröningsförsök i petriskålar, där fyra herbicider ur olika herbicidgrupper testas på sju populationer av renkavle, från tre olika länder. Försöket ingår i en jämförande studie mellan laboratorier i flera nordiska och baltiska länder. I utvärderingen ingår tre metoder; visuell bedömning av täckningsgraden, frekvensräkning av antal skott över 1 cm, samt ett torrsubstanstest för att avgöra den faktiska biomassan. De fyra herbiciderna är; fenoxaprop-P (i preparatet Event Super), cykloxidim (Focus Ultra), sulfometuron (Oust) och pendimetalin (Stomp).

I försöket hittades god överensstämmelse med den förväntade resistensgraden för en del av fröpartierna och herbiciderna. För andra fröpartier och herbicider var resultatet däremot inte det förväntade. Orsaken kan ha varit försöksfel. Testet skulle därför behöva upprepas för att kunna utesluta dessa eventuella fel som orsak till avvikelser, så att säkrare slutsatser kan dras om hur robust testet är.

Genom detta arbete har jag kommit fram till att det är svårt att hitta en robust snabbmetod för att upptäcka metabolisk resistens, men att det finns bra tester för target site-resistens. För target site-resistens är frötest i petriskålar ofta en bra metod, men eftersom metabolisk resistens oftast uppträder senare i plantans utveckling är dos-respons-tester i krukor att föredra.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

ABSTRACT	3
SAMMANFATTNING	4
1. SYFTE	7
1.1 Avgränsningar	7
2. LITTERATURSTUDIE	8
2.1 Definitioner av herbicidresistens	8
2.1.1 Normal funktion av herbicider	8
2.1.2 Herbicidresistens – en förändring i ogräsbeståndet	8
2.2 Beskrivning av renkavle och dess växtsätt	9
2.3 Hur ser resistenssituationen ut i världen?	10
2.3.1 Resistens globalt	10
2.3.2 Resistens i renkavle	11
2.4 Hur begränsas resistensuppbyggnad i renkavle?	11
2.4.1 Detektion	11
2.4.2 Odlingsåtgärder	12
2.5 Biokemiska verkningsmekanismer hos några viktiga gräsherbicider	14
2.5.1 ACCas-hämmande herbicider	14
2.5.2 ALS-hämmande herbicider	15
2.6 Resistensmekanismer	15
2.6.1 Target site-resistens	15
2.6.2 Metabolisk resistens	16
3. BAKGRUND TILL FÖRSÖKET	18
3.1 Beskrivning av preparaten som används i försöket	18
3.1.1 Event Super	18
3.1.2 Focus Ultra	18
3.1.3 Oust	19
3.1.4 Stomp	20
3.2 Snabbtester för detektion av resistens	20
4. MATERIAL OCH METODER	23
4.1 Uppräkning av frön	23
4.2 Förberedelser av petriskålar	23
4.3 Beredning av herbicidlösningar	23
4.4 Inkubation	24
4.5 Avläsning	24
4.5.1 Visuell bedömning	24
4.5.2 Frekvensräkning	24
4.6 Torrsubstans	25
5. RESULTAT	26
5.1 Klimatskåpen	26
5.2 Kontroll	26
5.3 Jämförelse av resultat mellan visuell bedömning och frekvensräkning	27
5.4 Resultat från frekvensmetoden	30

6. DISKUSSION	32
7. SLUTSATSER	34
8. REFERENSER	35
Personliga meddelanden	38
BILAGOR	39

1. SYFTE

Detta arbete har två syften: För det första, att ge en inblick i hur resistensproblemet ser ut i renkavle, framförallt ur ett svenskt perspektiv. För det andra syftar arbetet till att utvärdera en standardiserad metod för att upptäcka resistens. Detta görs genom ett groningsförsök i petriskålar, där fyra herbicider ur olika herbicidgrupper testas på sju populationer av renkavle, från tre olika länder. Försöket i detta arbete är ett delförsök i en jämförande studie (s.k. ringtest) mellan laboratorier i flera nordiska och baltiska länder, initierat av Nordic and Baltic Resistance Action Group (NORBARAG).

Syftet med arbetet är även att beskriva de verkningsmekanismer som ligger bakom en resistensutveckling, samt vilka åtgärder som kan sättas in för att minska en vidare utbredning av resistens.

1.1 Avgränsningar

En metodstudie görs, samt en litteraturstudie av herbicidresistens. Litteraturstudien kommer att begränsas till förklaringar av herbicidresistens, beskrivning av ogräset och preparaten som används i försöket, resistensutbredningen i världen, samt åtgärder för att minska en vidare resistensutveckling. En mer ingående del av biokemin för herbicidernas verkningsmekanismer, samt resistensmekanismer hos ogräset går igenom. I arbetet jämförs även försöksmetoden med andra metoder som avser att upptäcka resistens. Fokus för diskussionen ligger på metoder för detektion av resistens.

2. LITTERATURSTUDIE

2.1 Definitioner av herbicidresistens

2.1.1 Normal funktion av herbicider

När en planta bekämpas med en modern, systemiskt verkande herbicid, tas herbiciden upp i växten och verkar där på en eller flera målplatser. När herbiciden binder till målplatsen och blockerar den, förhindras en livsviktig funktion i växten (t.ex. fotosyntesen, bildning av vissa aminosyror eller fetter), och plantan dör (Prather et al., 2000).

Herbicider kan i många fall användas i växande grödor, utan att grödan tar skada. Det finns två typer av herbicider; selektiva och icke-selektiva. Icke-selektiva kallas de herbicider som skadar både de flesta ogräsarter och grödan, medan selektiva herbicider kan användas i växande gröda utan att påverka grödan negativt i någon större utsträckning. Grödans motståndskraft mot selektiva herbicider kan bero på att herbicidens specifika måltavla (oftast ett enzym) i ogräset, helt enkelt saknas hos grödan eller förekommer i en okänslig form. Grödan har vanligtvis också en bättre förmåga än ogräset att metabolisera (bryta ned) herbiciden.

Herbicider dödar vissa växtarter, men inte andra, eftersom de allra flesta herbicider har ett begränsat s.k. ogrässpektrum. Det innebär att arter inom en viss herbicids ogrässpektrum kan bekämpas effektivt, med en dos som är ekonomiskt och praktiskt rimlig. Andra ogräsarter befinner sig utanför herbicidens spektrum, och har därför en god motståndskraft mot bekämpningsmedlet. Sådan normalt förekommande motståndskraft mot en herbicid brukar inte kallas resistens.

2.1.2 Herbicidresistens – en förändring i ogräsbeståndet

En resistent ogräsplanta är en avvikande individ inom en art som normalt brukar kunna bekämpas väl med herbiciden i fråga. Den resistenta plantan kan inte kontrolleras med en väl utförd bekämpning med herbiciden i vanliga dosnivåer, eftersom den bär på en genetiskt betingad ökning av motståndskraften mot just den aktuella herbiciden, jämfört med normala plantor av arten.

Herbicidresistens beror oftast på en förändring av biokemin hos ogräset, men i vissa ovanliga fall även av förändringar i morfologin eller utvecklingsrytmen (Moss, 2002). Resistensmekanismerna varierar mellan olika grupper av herbicider och även mellan ogräsarter. Totalt sett dominerar resistensfall mot fyra herbicidgrupper: ACCas-inhibitorer (en typ av fettsyrsynteshämmare) och ALS-inhibitorer (hämmar syntes av vissa aminosyror, sulfonylureor tillhör denna grupp), samt två typer av fotosyntesinhibitorer; triaziner och ureor/amider som inhiberar fotosyntes II. Resistens mot dessa grupper uppgår till 91 % av alla herbicidresistensfall i Europa, medan utanför Europa uppgår de endast till 72 % av resistensfallen (Moss, 2003).

Enligt Moss (2002) är resistens en evolutionär process där en population gradvis ändrats från att vara mottaglig för en herbicid till att bli resistent. Resistens är ett resultat av slumpmässiga mutationer (Prather et al., 2000). HRAC (2011) hävdar att en liten andel individer i en ogräspopulation, genom en eller flera genmutationer, kan vara resistent mot en viss herbicid redan innan herbiciden har använts. Vid en bekämpning medför detta att resistent plantor selekteras fram och uppförökas, tills att populationen domineras av resistent individer. När populationen domineras av resistent plantor kan den kallas för en resistent population

(Prather et al., 2000). Oftast upptäcks inte den nedsatta effekten av bekämpningsmedel förrän 10-20 % av ogräspopulationen är resistent (Moss, 2002), men enligt Arvidsson et al. (1999) krävs att cirka 30 % av populationen är resistent för att resistens ska kunna fastställas. Det finns inga vetenskapliga bevis för att herbiciden i sig kan skapa en resistens (Prather et al., 2000), även om slumpmässiga mutationer kan ske även efter att herbicider har använts (Moss, 2002). Prather et al. (2000) hävdar att en herbicid enbart är en faktor som ökar selektionstrycket för resistent individer. Ett högre ogräsantal på fältet anses resultera i en större chans att resistent individer uppträder.

De flesta moderna herbicider verkar, som tidigare nämnts, på en specifik plats i växten, ofta genom att blockera något livsviktigt enzym, som i sin tur ofta kontrolleras av en enda gen. När resistens uppstår hos ogräset kan det räcka med en enskild mutation i den gen som kodar för herbicidens målenzym. Sådan resistens brukar benämnas specifik resistens (Sjödahl, 2005), eller target site-resistens. En mutation i en ensam gen hos växten ger, på grund av att bindningsstället för herbiciden ändras och blockeras, en stark resistens (Prather et al., 2000), även om undantag finns, t.ex. target site resistens mot glyfosat (Baerson et al., 2002).

Bred resistens är motsatsen till specifik resistens. Den innebär att flera gener är inblandade, och resistensgraden kan variera mellan plantor inom en ogräspopulation. Ett vanligt förekommande exempel på bred resistens är ökad metabolism hos ogräset (Sjödahl, 2005), s.k. nedbrytningsresistens. Ogräset får då en onormalt god förmåga att bryta ned bekämpningsmedlet, alltså ett liknande försvar som grödor ofta har mot selektiva herbicider. Metabolisk resistens är inte kopplad till herbicidens verkningsmekanism, utan kan slå mot herbicider ur vitt skilda herbicidgrupper.

Korsresistens innebär att en population är resistent mot minst två herbicider, antingen i samma kemiska klass eller i olika klasser, p.g.a. samma resistensmekanism mot herbiciderna (Moss, 2002).

En population kan också vara resistent mot två eller fler herbicider med olika resistensmekanismer, helt oberoende av varandra. Då benämns resistensen som multiresistens (Moss, 2002). Moss (2002) skriver att multiresistens uppträder allt oftare och kan komma att bli ett problem i framtiden.

2.2 Beskrivning av renkavle och dess växtsätt

Renkavle (*Alopecurus myosuroides* Huds.) är ett tuvbildande (Den virtuella floran, 2011), vinterannuellt gräsogräs. Renkavle hittas oftast på lerjordar, särskilt styv lera (Andersson, 2010), men kan även växa på sandjordar och i vägkanter (Den virtuella floran, 2011). Renkavle finns främst i områden där temperaturen ligger på minst 15 grader under juli månad (Thurston, 1972, i litteratursammanställning av Andersson, 2010). I Sverige har den sin utbredning i söder, främst i Skåne, på Öland och Gotland (Den virtuella floran, 2011), men enligt Wellander (2009) har ogräset även hittats i Östergötland och Västergötland. Renkavlens spridning har enligt Andersson (2010) till stor del berott på att dess frön funnits i utsäde. Att renkavle sedan klarar att överleva längre norrut kan bero på att vintrarna har blivit mildare, men även p.g.a. en alltmer reducerad jordbearbetning de senaste åren (Wellander, 2009). Att renkavle gynnas av direktsådd och reducerad jordbearbetning bekräftas av studier gjorda av Moss (1981, i litteratursammanställning av Andersson, 2010).

Renkavle kan bli upp till 60 centimeter hög och får en axlik vippa som kan bli ganska långt, upp emot 8 centimeter (Fogelfors, 2011). Ogräset har blågröna och långa blad (Den virtuella floran, 2011) med sträv ovensida och sträva bladkanter. Snärpet är långt, men växten saknar helt bladöron (Fogelfors, 2011). Vippan är först blågrön, men det är vanligt förekommande att den i solen får den brunaktig färg som kan skifta i violett. Denna färg är ett bra kännetecken för ogräset, enligt Den virtuella floran (2011). Varje småax har bara en blomma, och långa utstickande borst (Fogelfors, 2011).

Renkavle blommar i juni-juli (Den virtuella floran, 2011) i Sverige, och drösar enligt observationer utförda av Andersson (2010), från början av juli till slutet av augusti. Detta innebär att renkavlen hinner drösa innan skörd av höstvetete. I höstkorn däremot, som normalt skördas tidigare, hinner bara ca 50 % av renkavlen drösa innan skörd, enligt Andersson (2010). Renkavlens utbredning i Europa hänger starkt ihop med odling av höstvetete och höstkorn, fortsätter Andersson (2010). Moss (2003) hävdar att renkavle dessutom är ett konkurrenskraftigt ogräs som har möjlighet att snabbt öka sin population i höstsådda grödor.

Renkavle har p.g.a. sina grunt växande rötter hos de unga plantorna, en god förmåga att klara av vattenmättade jordar under hösten. Plantorna avstannar sin tillväxt när temperaturen är nere på 5 grader och unga plantor kan klara temperaturer ner till -8 grader (Andersson, 2010). Detta medför att renkavlen övervintrar längre söderut i Sverige där mildare vintrar förekommer.

2.3 Hur ser resistenssituationen ut i världen?

2.3.1 Resistens globalt

Prather et al. (2000) skriver att 233 ogräsarter i världen uppvisar resistens. Heap (2011) däremot skriver att 197 ogräsarter uppvisar resistens i nuläget, och då i 358 olika biotyper. Moss (2002) hävdar att det ofta är svårt att avgöra den faktiska omfattningen av resistens i ett område, samt den ekonomiska påverkan resistensen har. Detta beror på att det finns dåligt med mätdata i många länder. Det finns flera definitioner och konfirmationskriterier på resistens, som dessutom har reviderats ett antal gånger genom åren.

År 1970 rapporterades i Washington det första fallet av herbicidresistens. Resistensen uppträdde i korsört (*Senecio vulgaris*) (Prather et al., 2000). Triaziner (som inhiberar fotosyntesen) är den grupp av herbicider som dominerar vad gäller konstaterade resistensfall hos ogräs världen över. Därefter på listan hamnar sulfonylureor (som inhiberar celldelning) (Prather et al., 2000).

Globalt sett är intensiva jordbrukssystem det som främst har ökat herbicidresistensen. Detta gäller särskilt för Nordamerika, Europa och Australien med intensiva jordbruksmetoder (Moss, 2002). Även på andra kontinenter som Asien, Syd- och Centralamerika har resistensen fått en större utbredning i takt med införandet av ett mer intensivt jordbruk (Moss, 2002). I utvecklingsländer befaras resistensökningen att fortsätta eftersom tillgången på bekämpningsmedel med skilda verkningsmekanismer är ännu mer begränsad än i utvecklade länder, fortsätter Moss (2002). I Europa har många pesticider försvunnit i samband med hårdare reglering före registrering av bekämpningsmedlen. Detta bidrar till en minskad variation i den kemiska bekämpningen, vilket kan öka risken för resistensuppbyggnad (Coelho, 2009, refererat av Délye et al., 2011)

2.3.2 Resistens i renkavle

Det första fallet av resistens i renkavle, resistens mot det verksamma ämnet klorotoluron, hittades i Essex, Storbritannien i början på 1980-talet (Moss & Cussans, 1985, i litteratursammanställning av Reade & Cobb, 1999). Hos renkavle har resistens nu konstaterats i Storbritannien, Belgien, Danmark, Frankrike, Tyskland, Nederländerna, Spanien, Sverige och Schweiz (Moss, 2003). Det finns även dokumenterade fall i Turkiet och Israel, enligt Heep, 2011.

Moss (2003) skriver om Rothamsted Reserarch som gjorde en undersökning av resistens hos renkavle år 2002 i Storbritannien. Där konstaterades att alla gårdar i Storbritannien som använde sig av herbicider mot renkavle hade resistens i arten mot åtminstone en herbicid. 80 % av gårdarna hade resistens mot fenoxaprop-P (en fettsyrsyntes-hämmande herbicid) och 84 % uppvisade resistens mot klorotoluron (en fotosynteshämmare). En ökning från 7 % till 84 % resistens mot klorotoluron hade skett på bara ca 10 år.

Resistenssituationen i renkavle ser dock annorlunda ut i Sverige. Event Super (verksam beståndsdel; fenoxaprop-P) och Focus Ultra (cykloimid) är mycket vanligt förekommande preparat i Sverige. Undersökningar av herbicidresistens hos renkavle i Skåne visar att ogräset är resistent just mot dessa två preparat (Hallqvist, 2009; 2010), som båda verkar genom att hämma bildning av fetter. Resistens mot Event Super har funnits redan tidigare år. En minskad känslighet för Boxer (ett vanligt förekommande preparat som hämmar bildning av fetter på ett annat sätt än Event Super och Focus Ultra gör) har uppträtt på många fält, men resistens kan ännu inte konstateras (Hallqvist, 2009). Däremot hittades i ett försök från 2010 resistens mot Lexus (en sulfonylurea, hämmar bildning av vissa aminosyror) för första gången. Den minskade känsligheten för Lexus är ofta kopplad till kraftig resistens mot Event Super (Hallqvist, 2009). Eftersom dessa preparat har skilda verkningsmekanismer skulle detta kunna bero på att Lexus har en metabolisk korsresistens med Event Super.

I Sverige har renkavle endast en generation per år, medan den kan ha flera generationer per år längre ner i Europa. Detta medför att selektionen för resistens sker mycket snabbare längre söderut, vilket starkt påverkar växtodlingen i Europa (Arvidsson et al., 1999). Trots att selektionstrycket inte är lika stort i Sverige har ökade svårigheter med bekämpningen av renkavle ändå upplevts i landet (Arvidsson et al., 1999). Enligt en intervju med växtodlingsrådgivare i Skåne (Wikström, 2010) är resistensproblemet störst i nordvästra Skåne, men eftersom Event Super och Focus Ultra är de preparat som används flitigast i utbredningsområdet, förutspås att det bara är en tidsfråga innan gårdar med icke-resistenta populationer får problem i framtiden.

2.4 Hur begränsas resistensuppbyggnad i renkavle?

2.4.1 Detektion

Fältobservationer ger enligt Moss (1999) en första indikation på resistens, men säger inget om resistensgrad eller om den nedsatta herbicideffekten beror på andra faktorer, såsom hur förhållandena såg ut när ogräset bekämpades. Resistens i renkavle bör misstänkas när andra mottagliga ogräsarter fortfarande kan kontrolleras med herbiciden, medan renkavlen plötsligt överlever en i övrigt lyckad bekämpning. Även levande plantor bredvid döda plantor av samma art kan vara ett tecken på att resistens förekommer, förutsatt att de befunnit sig i samma tillväxtfas under bekämpningen.

Faktorer som påverkar herbicideffekten är rätt tidpunkt för bekämpning, rätt dos, väderlek, temperatur, markförhållanden etc. För att kunna konstatera resistens räcker det inte att enbart utesluta dessa faktorer som orsak till den dåliga effekten. Det behövs ett utförligare test (Moss, 1999).

Det finns ett flertal metoder för att upptäcka resistens, däribland insamling av frön för labtest, krukttester där hela plantor testas, dostester, pollentester, DNA-tester m.fl. En bra testmetod är enligt Moss (1999) snabb och lätt att utföra, billig, ger ett exakt resultat och en bra bild över hur resistensnivån ser ut på övriga delar av fältet.

2.4.2 Odlingsåtgärder

Enligt Moss (2002) är det främst fyra faktorer som påverkar herbicidresistensen hos ett ogräs: längden på livscykel, spridning av ogräset, metoder för ogräskontroll, samt fröbanken i marken.

Kontroll av livscykel: Livscykeln för renkavle verkar inte vara en betydande faktor längre, påstår Moss (2002), eftersom resistens har ökat även där livscykeln kunnat kontrolleras genom att förebygga att ogräset sätter frö. Det är ändå viktigt att ligga ett steg före ogräset och minska dess uppkomst (och därmed också frösättning) genom att noga tänka igenom växtföljd, såtidpunkt, utsädesmängd etc.

Viktigast av allt är att lägga upp en bra växtföljdsplan så att ogrästrycket hålls nere redan från start (Arvidsson et al., 2009). I en växtföljd där t.ex. höstsådda spannmålsgrödor odlas år efter år blir det svårare att kontrollera ett höstgroende gräs som renkavle. Bäst är att variera höstsådda och vårsådda grödor eftersom det ger en bättre möjlighet till bekämpning. Enligt rekommendationer från Weed Resistance Action Group (WRAG, 2010) kan renkavle kontrolleras upp till 80 % i vete med hjälp av en vårgroda, jämfört med 67 % genom att plöja.

En tidig sådd på hösten gynnar renkavle eftersom den både hinner få en bra uppkomst och bestockning inför vintern (Andersson, 2010). I England visar undersökningar att sådd av höstveten innan den 25 oktober leder till en uppförökning av renkavle, medan sådd efter den 5 november leder till en minskning (Bond et al., 2007). Sen sådd på hösten är därför att rekommendera. Där sen sådd inte fungerar, t.ex. på lerjordar, kan en tidig sådd istället kompenseras genom att öka utsädesmängden eller minska radavståndet eftersom perioden för jordbearbetning och sådd under optimala förhållanden kan vara mycket kort (Wikström, 2010). Hög utsädesmängd och mindre radavstånd ger då en mer konkurrenskraftig gröda mot ogräset (WRAG, 2003).

Spridning av ogräset: Ett bra sätt att minska rörligheten av ogräset inom och mellan åkrarna är att vara noggrann med rengöringen av maskiner. Frön sprids lätt med tröskan eller maskiner för jordbearbetning (WRAG, 2003). I övrigt är det bra att ha kännedom om hur ogrässituationen och resistensutvecklingen ser ut på gården, men även i närområdet. Övervaka därför fälten regelbundet. WRAG (2003) rekommenderar även att testa de misstänkta fälten för resistens, vart tredje år.

Metoder för ogräskontroll: Den främsta anledningen till att resistens har utvecklats i renkavle är att alldeles för få preparat, och därmed ett fåtal verkningsmekanismer, har använts år efter år. Detta innebär att resistenta plantor selekteras fram och uppförökas. Problemet beror främst på det begränsade antalet preparat som kan användas för bekämpning av årliga gräsogräs i stråsådesgrödor, vilket gör att samma preparat återkommer för ofta vid bekämpning (Espeby

& Fogelfors, 2006). WRAG (2003) rekommenderar därför en integrerad bekämpningsstrategi med mer mekaniska åtgärder för att få en mer långsiktig kontroll av renkavle.

Vad gäller den kemiska bekämpningen så är nyckelstrategin att växla mellan preparat med olika verkningsmekanismer. När resistens har utvecklats för ett preparat kan ett annat med skild verkningsmekanism väljas. Det är viktigt att vara medveten om att en risk för resistens även mot det nya preparatet finns (WRAG, 2003). WRAG (2003) rekommenderar att inte förlita sig på ”fops” och ”dime” (hit hör Event Super och Focus Ultra), och inte heller ALS-inhibitorer, som t.ex. sulfonyleureor. Dessvärre har upptäckter på senare år visat många fall av samtidig resistens mot herbicider med helt olika verkningsmekanismer. Troligen rör det sig om korsresistens av bred typ, alltså inte förändringar som har med herbicidens målenzym/”target site” att göra, utan snarare t.ex. metabolisk resistens. I renkavle har man funnit att resistens mot herbicider med en viss verkningsmekanism faktiskt har selekterats fram genom användning av herbicider med helt andra verkningsmekanismer (Délye et al., 2011).

En fördel är om herbicidens verkningsmekanism finns utskriven på förpackningen av preparatet, så att möjligheten att växla mellan mekanismerna blir enklare. Australien var enligt CropLife Australia (2010) det första landet att introducera obligatorisk märkning efter verkningsmekanism, men det är viktigt att titta på vilken form av märkning som görs eftersom alla länder ännu inte har samma klassifikationssystem. I Europa är det inte vanligt med en märkning efter verkningsmekanism enligt Moss (2003).

Ett annat sätt att minska resistens är att variera mellan höga och låga doser, istället för att använda samma dos varje gång. Resistens byggs normalt sett upp efter en rad låga doser, men för att bryta resistensutvecklingen tillsätts en hög dos för att ta död på de individer som överlevt tidigare bekämpningar (Gardner et al. 1999). Frågan är om detta är en hållbar metod eller om resistensen bara fördröjs? Varierande doser är enligt Gardner et al. (1999) en kostnadseffektiv metod och har en mindre inverkan på miljön än om enbart höga doser skulle användas. En tillräckligt hög dos ska ändå alltid användas för att säkerställa resultatet enligt Hallqvist (2009). Vilken typ av resistens som förekommer ger även en ökad möjlighet att anpassa rätt dos. Specifik resistens gynnas i regel, men inte alltid, av höga doser och framträder snabbare än bred resistens, som gynnas av låga doser (Arvidsson et al., 1999).

Bekämpning av renkavle ska alltid ske på hösten och upprepas på våren vid behov. För att få ut en maximal effekt mot resistent ogräs ska besprutningen utföras på små och aktivt växande plantor (WRAG, 2003). Precis som vid annan bekämpning ska bekämpningen ske med bra teknik och under bra förhållanden (Hallqvist, 2009). Hallqvist (2009) skriver även att hela fält ska behandlas, medan Arvidsson et al. (2009) anser att fläckar eller delar av fält med mycket ogräs kan behöva behandlas separat.

Tankblandningar av herbicider med skilda verkningsmekanismer och minskade doser kan användas. Om tankblandningar görs är det viktigt att tänka på att herbiciderna ska ha ungefär samma effekt på ogräset, trots skilda verkningsmekanismer (Arvidsson et al., 2009). Enligt WRAG:s rekommendationer (2003) ska minst två herbicider i tankblandningen ha effekt på renkavle. Precis som frekventa användningar av samma herbicider ska inte samma tankblandningar utföras alltför ofta eftersom risken för multiresistens ökar (WRAG, 2003).

Fröbanken i marken: Herbicidresistensen kan minskas med kontroll av fröbanken i jorden genom att utföra jordbearbetning på rätt sätt, exempelvis med stubbearbetning och en senare

plöjning (Arvidsson et al., 2009). WRAG (2003) rekommenderar plöjning vart annat till vart femte år, för att vända ner de frön som finns i översta delen av matjorden. Renkavlefrön har en relativt kort livslängd i jorden, merparten överlever endast 3-5 år enligt Fogelfors (2011). På grund av denna korta överlevnadstid minskar plöjning ogräsförrådet på längre sikt. Andersson (2010) förklarar att om fröbanken av renkavle är liten så minskar plöjning uppkomsten, men om problem med renkavle har funnits en längre tid, d.v.s. fröbanken är stor, så vänds fröna istället upp vid plöjning. Dessa frön är oftast äldre och mindre selekterade, vilket ger en ökad andel plantor som är mottagliga för herbicider (WRAG, 2003). Fröna kan då lockas att gro med en s.k. falsk såbädd, för att därefter bekämpas.

Reducerad jordbearbetning ska bara utföras om fröbanken är liten och när en mycket liten andel renkavle uppträtt i den nyligen skördade grödan, enligt WRAG:s rekommendationer (2003).

Det hela kan sammanfattas nedan:

Tabell 1: Bearbetning för kontroll av renkavle

Renkavle	Fröbank : liten	stor
Fröproduktion: liten	Plöjning tillräckligt med 1 år av 3	Grund bearbetning med plöjning 1 av 3-4 år
stor	Grund bearbetning	Plöjning

(Tabell tagen från Fogelfors, 2011)

2.5 Biokemiska verkningsmekanismer hos några viktiga gräsherbicider

2.5.1 ACCas-hämmande herbicider

Enzymet acetyl-coenzym-A-carboxylas (ACCas) katalyserar det första steget i bildningen av fettsyror (Reade & Cobb, 2002) och fettsyrasyntesen stoppas därmed med ACCas-inhibitorer (Andersson, 2010). Lipider spelar en viktig roll i växternas cellmembran. De behövs för att upprätthålla en bra struktur i växten, kunna transportera ämnen och har också viktig roll i processerna för respiration och fotosyntes (Reade & Cobb, 2002). Eftersom ACCas har en viktig roll i fettsyrasyntesen, finns ämnet i hög grad hos unga plantor som har en snabb celldelning och många aktiva kloroplaster. Effekten av herbicider som inhiberar ACCas fungerar därför bäst när ogräset växer aktivt (Reade & Cobb, 2002).

Det finns två typer av ACCas-inhibitorer, aryloxyfenoxypionater ("fops") och cyklohexanedioner ("dims") (Moss, 2002). Dessa är helt olika kemiskt sett, men eftersom de har samma verkningsmekanism uppstår korsresistens ofta mellan grupperna (Moss, 2002).

Enzymet ACCas ser annorlunda ut hos monokotelydoner och dikotelydoner. Dikotelydoner har förutom det plastidiska ACCas som finns i cellens kloroplaster hos gräs, ytterligare ett ACCas; cytosoliskt ACCas som finns i cellplasman. Cytosoliskt ACCas påverkas inte av "fops" eller "dims" (Reade & Cobb, 2002), vilket betyder att dikotelydoner inte är känsliga mot ACCas-inhibitorer som används för att bekämpa gräsogräs (Moss, 2002). Det kan tyckas

konstigt att spannmål överlever en behandling av ACCas-inhibitorer. Spannmål verkar enligt Reade & Cobb (2002) ha utvecklat en ökad metabolism av vissa ACCas-hämmare, som herbiciden fenoxaprop-P. Denna herbicid är selektiv mot korn, och genom att tillsätta en ”herbicide safener”, kan motståndskraften mot herbiciden ökas hos vete och råg, så att även dessa grödor kan bryta ned herbiciden utan att skadas (Kemikalieinspektionen, 1997).

2.5.2 ALS-hämmande herbicider

Ett annat viktigt enzym i växten är acetolaktatsyntas (ALS). Det är ett plastidiskt enzym och finns i cellernas kloroplaster. Enzymet är viktigt eftersom det katalyserar de första stegen i biosyntesen för aminosyrorna leucin, isoleucin och valin. Dessa aminosyror behövs för växtens celledelning och tillväxt. Herbicider med ALS-inhibering stoppar därför celledelningen väldigt snabbt och plantan dör (Reade & Cobb, 2002). Precis som för ACCas-inhibitorer har spannmål utvecklat en förmåga att metabolisera ALS-herbicider. Flyghavre kan inte, trots nära släktskap med havre, metabolisera ALS-herbicider (Reade & Cobb, 2002).

2.6 Resistensmekanismer

Hos renkavle är två resistensmekanismer konstaterade; target site-resistens och resistens genom förändrad metabolism (Andersson, 2010).

2.6.1 Target site-resistens

Den allra vanligaste mekanismen för herbicidresistens är enligt Moss (2002) target site-resistens. Resistensen innebär att målenzymet förändras (Andersson, 2010) och bindningsstället för herbiciden blockeras (WRAG, 2003) genom att genen som kodar för enzymet ändras. Eftersom herbiciden inte kan binda till den ändrade målplatsen, så kan växten fortfarande bilda de viktiga aminosyrorerna, och överlever behandlingen (Reade & Cobb, 2002). Det kan räcka med en förändring i ett enda baspar i den gen som kodar för målenzymet. Ett eller flera basparsändringar kallas punktmutation. Detta resulterar ofta i en absolut, icke dosberoende, resistens mot herbiciden (WRAG, 2003). När plantor med absolut resistens sedan sprider sig kan det bildas stora, resistenta populationer mycket snabbt (WRAG, 2003).

Enligt WRAG (2003) har två typer av target site-resistens hittats i Storbritannien hos renkavle, nämligen resistens mot ACCas-inhibitorer och ALS-inhibitorer.

Target site-resistens mot ACCas-inhibitorer beror på att en punktmutation har skett i den gen som kodar för enzymet ACCas. Minst fem olika sådana punktmutationer har hittills upptäckts i renkavle. Några av dem har även hittats i andra gräsogräs, som rajgräs och flyghavre. Den vanligaste förekommande av dess punktmutationer gör att aminosyrasekvensen i proteinet ACCas ändras från isoleucin till leucin på platsen *Ile*₁₇₈₁ i enzymet (Délye et al., 2007).

En punktmutation i *Ile*₁₇₈₁ ger en ACCas- target site-resistens mot både fenoxaprop-P och cykloxidim (Heap, 2011). Det första svenska exemplet på mutation i renkavle uppstod i *Ile*₁₇₈₁ (Espeby, 2010). Även om *Ile*₁₇₈₁ är den vanligaste mutationen i renkavle är det viktigt att tänka att det fortfarande kan finnas target site-resistens hos ogräset genom någon av de andra punktmutationerna, som kan ge andra korsresistensmönster än det som *Ile*₁₇₈₁ ger.

Det finns flera olika kemiska grupper av ALS-hämmande herbicider, men alla är verksamma vid samma målplats på enzymet. När resistens mot ALS-herbicider uppträder finns därför ofta en korsresistens med andra kemiska grupper med samma verkningsmekanism (Prather et al.,

2000). De olika mutationer som har identifierats vid resistens mot ALS-inhibitorer, ger olika grad av resistens inom grupperna av ALS-inhibitorer (Moss, 2002). Flera mutationer har lett till en stark resistens mot sulfonylureor. Olika mutationer kan förekomma samtidigt i den enskilda växten och i beståndet, vilket kan försvåra bekämpningen eftersom korsresistensmönstret kan variera kraftigt mellan individerna. Moss (2002) hävdar att det är svårt att förutsäga i vilken grad resistens kommer att påverka ALS-inhibitorerna i framtiden.

2.6.2 Metabolisk resistens

Resistens hos renkavle kan också uppstå genom en ökad nedbrytning av den aktiva substansen i herbiciden (Andersson, 2010).

Ogräs som tillhör en viss herbicids ogrässpektrum har normalt sett inte förmågan att bryta ned det verksamma ämnet i herbiciden, utan klarar det först om resistens uppstår genom ökad metabolism. Denna ökade metabolism kan variera i grad, allt från att herbiciden får en sämre verkan, till att den inte dödar ogräset alls (Moss, 2002). Resistensen uppträder därför smygande.

Viktigt att notera är att ogräset inte har "tagit över förmågan" från grödan genom inkorsning, utan att resistensen har uppstått genom mutationer i ogräsets eget genom.

Som tidigare beskrivits, används s.k. "herbicide safeners" i preparat avsedda att användas i t.ex. vete. Studier och försök visar att dessa "safeners" inte ökar motståndskraften eller metaboliseringsförmågan hos vare sig renkavle, flyghavre eller italienskt rajgräs (Moss, 2002).

Ogräs som är resistent genom ökad metabolism har ofta en lägre nivå av resistens än target site-resistent (Prather et al., 2000). Normalt framträder den ökade metabolismen gradvis och långsammare än target site-resistens (Moss, 2002), men ett selektionstryck för ökad metabolism kan ändå ske snabbt om samma herbicid används ofta (Prather et al., 2000).

I Storbritannien är ökad metabolism enligt WRAG (2003) den vanligaste mekanismen för resistens hos gräsogräs, medan Moss (2002) skriver att target site-resistens är den vanligaste mekanismen. Kanske kan de flesta bedömare ändå enas om att target site-resistens är enklare att upptäcka och diagnostisera än metabolisk resistens, så att betydelsen av den senare typen länge kan ha underskattats.

Flera helt olika herbicider kan selektera fram metabolisk resistens trots att byten mellan verkningsmekanismer sker vid bekämpning. Det förekommer fall där ogräset samtidigt har både target site-resistens och metabolisk resistens mot antingen samma, eller mot olika herbicider. I Frankrike visade ett försök att mer än 75 % av alla plantor som var resistent mot ACCas-hämmare (d.v.s. target site-resistens) även skulle kunna vara resistent mot ACCas-hämmare genom ökad metabolism (Délye et al., 2007). Délye et al. (2007) hävdar också att skälet till att resistens genom ökad metabolism hittats mot fenoxaprop-P, men inte cykloxidim är tiden för selektion, d.v.s. att fenoxaprop-P har funnits på marknaden en längre tid än cykloxidim.

Délye et al. (2007) understryker att det krävs mer forskning för att förstå metabolisk resistens, medan mekanismen för target site-resistens mot ACCas-hämmare däremot är väl studerad.

När herbiciden bryts ned i växten sker det i olika steg; bioaktivering, metabolisk attack/konjugering och lagring (Reade & Cobb, 2002). Vid bioaktiveringen aktiveras

herbiciden och blir giftig för växten. Den måste sedan detoxifieras med hjälp av metabolisk attack och/eller konjugering. I flera resistent ogräsarter har det visat sig vara två enzymgrupper som är extra viktiga i dessa processer. Dessa enzymer är cytokrom-P450-mono-oxygenaser och glutation-S-transferaser (GST) (Moss, 2002).

Vid en metabolisk attack detoxifieras det verksamma ämnet i herbiciden med hjälp av ett enzym. Här har gruppen P450-enzymen en viktig roll. P450-enzymen är membranbundna och finns i hela plantan. De har en viktig roll i att bryta ned många oönskade ämnen i växten, men skyddar även växten från patogener eller andra stressorsaker.

Vid konjugering sker en fastläggning av herbicidens verksamma ämne till en icke-giftig molekyl. Konjugering kan vara en fortsättning på den reaktionen som skett vid metabolisk attack, men det behöver inte alltid vara så. En konjugering, där molekylerna ombildas genom en serie reaktioner, kan även ske på egen hand (Reade & Cobb, 2002).

De mest kända enzymerna i konjugeringsreaktioner är glutation-S-transferaser (GST) (Reade & Cobb, 2002). GST har studerats väl hos djur, men är inte lika väl studerat hos växter ännu (Reade & Cobb, 1999). Grödor har oftast en högre halt av GST än ogräs, vilket gör att de kan bryta ned många herbicider bättre än de flesta ogräsarter. Fenoxaprop-P är ett ämne som snabbt kan detoxifieras med hjälp av glutationkonjugering, framförallt i vete (Tal et al., 1993, i litteratursammanställning av Cummins et al., 1997). Flera försök (Reade & Cobb, 1999; Cummins et al., 1997; Cocker et al., 1999) visar att nästan dubbelt så höga värden av GST hittades i resistent renkavle behandlat med fenoxaprop-P, jämfört med i mottagliga renkavlepopulationer. Studierna visar att resistensen berodde på en ökad metabolism, men att den skulle vara orsakad av GST kunde inte fastställas.

I sista steget i metabolismen flyttas herbiciden från cytoplasman i cellen. Den kan då antingen brytas ned ytterligare i vakuolen eller lagras, antingen i vakuolen eller bindas in i cellväggen. (Reade & Cobb, 2002).

3. BAKGRUND TILL FÖRSÖKET

3.1 Beskrivning av preparaten som används i försöket

3.1.1 Event Super

I detta försök används Primera Super, men Sveriges motsvarighet till bekämpningsmedlet är Event Super. Det är därför mer aktuellt att ta upp Event Super i detta arbete. Både Primera Super och Event Super innehåller samma verksamma ämne i samma koncentrationgrad. Det som kan skilja bekämpningsmedlen åt kan vara en övrig beståndsdel, t.ex. vätmedel. I försök kan övriga beståndsdelar uppvisa mycket små skillnader i effekt, men det påverkar troligtvis inte detta försöksresultat.

Användningsområde: ”Mot flyghavre, renkavle och åkerven i odlingar av vete, råg, rågvete och korn” (Bayer CropScience, 2011). Bekämpning tillåts både på hösten och på våren, men inte i höstkorn under hösten. Event Super får också användas vid insådd av vall eller fånggröda, men lämpar sig inte i timotej och ängsgröe eftersom dessa tar skada av herbiciden. Övriga gräs och klöver går bra. Enligt Bayer CropScience (2011) kan Event Super användas i tankblandningar med flera andra bekämpningsmedel, vilket gör den till en smidig herbicid.

Kemi: Det verksamma ämnet i preparatet är fenoxaprop-P (etylester), 70 g/l. Ämnet är systematiskt verkande och bladverkande. Det tas alltså upp via bladen och transporteras vidare i växten, främst till tillväxtpunkterna (Bayer CropScience, 2011). Vid tillväxtpunkterna hämmar herbiciden fettsyraabildningen i växten (Kemikalieinspektionen, 1997). När fettsyraabildningen hämmas stoppas celledningen och detta tar ca 2-3 dagar. De första symptomen ses efter någon vecka, men plantan är inte helt död förrän efter ca 17-21 dagar efter bekämpning (Bayer CropScience, 2011). Fenoxaprop-P bryts ned snabbt i jorden och binds även starkt till jordpartiklar, vilket gör att den inte anses ha någon negativ effekt på omgivande miljö (Kemikalieinspektionen, 1997).

Event Super tillhör HRAC grupp A, ACCas- inhibitorer (Heap, 2011). HRAC, ”Herbicide Resistance Action Committee”, är en internationell samarbetsorganisation som arbetar med att utveckla strategier för att hantera problem med herbicidresistens världen över. HRAC har klassificerat bekämpningsmedel i grupper efter verksamt ämne och verkningsmekanism (Heap, 2011).

Användning i Sverige: 2009 såldes 0,9 ton fenoxaprop-P, vilket är en kraftig minskning från 2008 års försäljning med 4,3 ton (Kemikalieinspektionen, 2010). Mellan år 2005 och 2008 har försäljningen legat från 2,9 ton (2006) till 4,3 ton (2008). En kraftig minskning har alltså skett under dessa år.

3.1.2 Focus Ultra

Användningsområde: Focus Ultra används mot gräsogräs i många tvåhjärtbladiga jordbruks- och trädgårdsgrödor (Kemikalieinspektionen, 1997). Herbiciden kontrollerar både perenna och årliga gräs, förutom vitgröe och rödsvingel (BASF Crop Protection Sverige, 2011). BASF Crop Protection Sverige (2011) skriver att användningen sker i följande grödor: ”blomkål, bönor, energiskog, jordgubbar, foder- och kokärter, klöverfrö, lusern, lök, morötter, raps, rybs, rödsvingel, selleri, sockerbetor, vitkål, potatis (ej färskpotatis) senast när blasten är 20 cm hög, i plantskolor samt efter skörd i odlingar av hallon, rabarber och svarta vinbär”.

Kemi: Det verksamma ämnet i Focus Ultra är cykloxidim, 100 g/l och preparatet innehåller även aromatiska kolväten, 430 g/l (BASF Crop Protection Sverige, 2011). Focus Ultra tillhör HRAC grupp A, ACCas- inhibitorer (Heap, 2011). Herbiciden är bladverkande och tas därför upp av växtdelar ovan jord (BASF Crop Protection Sverige, 2011). Cykloxidim hämmar, precis som Event Super, fettsyrsyntesen via ACCas (Andersson, 2010). Det tar lång tid innan ogräset dör, ungefär 3-5 veckor. Ogräset påverkas långsammare av cykloxidim än av fenoxaprop-P (Reade & Cobb, 2002).

Användning i Sverige: 2009 såldes 7,5 ton cykloxidim i Sverige, vilket är en ökning från 2008 års försäljning med 6,8 ton. Mellan år 2005 och 2009 har försäljningen ökat från 5,3 ton (2005) och 7,5 ton (2009) (Kemikalieinspektionen, 2010).

3.1.3 Oust

Oust är en icke-selektiv herbicid (Marshall & Moss, 2008) med ett brett spektrum som, med hjälp av höga doser, kan användas för att ta död på all vegetation (Cox, 2002). Oust verkar på allt från annuella och perenna gräsogräs till tvåhjärtbladiga ogräs, men kontrollerar inte knölar, rhizom, små träd eller buskar (DuPont, 2009).

Användningsområde: T.ex. vägkanter, runt staket, lagringsplatser, industriområden (Cox, 2002) flygplatser, järnvägar, avloppshanteringsområden, gårdsplaner, parkeringsplatser m.m. (DuPont, 2009). Oust förekommer även i produktionsskog som ett selektivt bekämpningsmedel. Det används alltså sällan inom jordbruket (Cox, 2002), eftersom det inte får användas på grödor som odlas för mat eller foder (DuPont, 2009). Bekämpningsmedlet kan finnas kvar i jorden en lång tid efter bekämpning. Grödor avsedda för mat, foder, trädgård eller fiber får inte odlas förrän tidigast ett år efter bekämpningen (DuPont, 2000-2002, i litteratursammanställning av Cox, 2002). Oust används inte i Sverige (Kemikalieinspektionen, 2010).

Kemi: Det verksamma ämnet i Oust är sulfometuron-metyl. Sulfometuron-metyl tillhör den kemiska gruppen sulfonylureor (Cox, 2002) och tillhör HRAC grupp B, ALS-inhibitorer (Heap, 2011). Det verksamma ämnet tas upp av både rötter och blad vid besprutning (DuPont, 2009). Sulfometuron-metyl har effekt på ogräset genom att stoppa celldelningen i rotspetsarna, och detta sker genom ALS-inhibition.

Det dröjer 2-3 veckor efter bekämpningen innan tillväxten börjar avstanna och symptom visar sig, och efter 4-6 veckor är plantan död (DuPont, 2009).

Sulfonylureor är en relativt ny kemisk grupp och har endast använts sedan början av 1980-talet (Cox, 2002). Cox (2002) hävdar därför att lite kunskap finns om hur dessa påverkar naturen. Sulfonylurea-resistenta ogräs som aldrig tidigare har bekämpats med sulfonylureor har påträffats, vilket Cox (2002) påstår sig innebära att populationer snabbt kan selektera fram resistenta plantor. Endast efter fyra bekämpningar har resistenta populationer framträtt (Whitcomb, 1999, i litteratursammanställning av Cox, 2002).

Sulfometuron är en bra indikator och testprodukt för ALS target site-resistens och används därför i försöket (Marshall & Moss, 2008).

Användning i Sverige: Ingen användning av sulfometuron-metyl i Sverige. Däremot finns det många godkända preparat inom den kemiska gruppen sulfonylureor i Sverige, t.ex. Lexus, Monitor, Express och Harmony (Kemikalieinspektionen, 2010).

3.1.4 Stomp

Användningsområde: Mot ogräs i lök, morötter och bruna bönor (BASF Crop Protection Sverige, 2011). Tidigare godkänd men användning sker numera på dispens (Kemikalieinspektionen, 2008).

Kemi: Det verksamma ämnet i herbiciden är pendimetalin, 400 g/l. Dow AgroSciences (2011) skriver att pendimetalin används för att kontrollera årliga gräsogräs och tvåhjärtbladiga ogräs.

Pendimetalin tillhör HRAC grupp K1 (Heap, 2011) och tillhör kemikalierna dinitroaniliner (Dow AgroSciences, 2011). Pendimetalin inhiberar celledelning genom att det avbryter sammanfogningen av mikrotubuli vid kromosom-separationen (WRAG, 2003) i cellcykelns prometafas (Reade & Cobb, 2002). Symptom efter behandling visar sig genom att rotspetsarna svullnar innan plantan dör (Reade & Cobb, 2002).

Pendimetalin är en bra indikator för metabolisk resistens och används därför i försöket (Espeby, 2010).

Användning i Sverige: Ingen försäljning år 2009 p.g.a. förbud mot Stomp. År 2008 gjordes en kraftig försäljning på 15,5 ton. Detta är ett extremt värde mot tidigare års försäljning som mellan 2005 och 2008 låg på 3,1- 4,8 ton (Kemikalieinspektionen, 2010).

3.2 Snabbtester för detektion av resistens

Det finns idag flertalet snabbtester för att fastställa resistens, t.ex. ”Syngenta Quick Test”, ”Syngenta RISQ test” och ”Rothamsted Rapid Resistance Test”. Det senare är den metoden som använts i detta försök. Jag kommer att avgränsa mig till att presentera fördelar och nackdelar med planttester, respektive frötester.

Frötester: De mest testade metoderna för resistens är frötester och de anses därför vara de mest säkra (Boutsalis, 2001). Misstänkta frön samlas in och testas, antingen i petriskålar eller genom att odlas upp i krukor, och behandlas sedan med herbicider i en serie doser. Resultaten bedöms sedan visuellt genom att titta på andelen döda växter, genom att utföra mätningar på bladen (Moss, 1999), eller genom att räkna andelen grodda frön. Det är viktigt att få en bra kvalitet på fröna, genom att de samlas in vid rätt tidpunkt, rätt väderförhållanden och sedan packas rätt för att de inte ska kontamineras inför försöket. Moss (1999) rekommenderar att fröna samlas in när ungefär 20 % redan har drösat.

I ett moget stadium kan det vara svårt att särskilja resistent och känsliga plantor vid insamlingen i fält. Det kan hända att frön samlas in från både resistent plantor som överlevt herbiciddosen och från plantor som grott efter att bekämpningen utfördes (Boutsalis, 2001). Kaundun et al. (2010) fick t.ex. stora skillnader när ett kruktest och ett test i petriskålar jämfördes, och kom fram till att resultatet kunde ha berott på att proportionen av resistent individer skiljde sig när fröna uttogs. Å andra sidan kan resistensgraden på ett fält överskattas om istället enbart resistent frön samlas in, men kan ge en tidigare indikation på resistens.

Frötest i petriskålar är en bra metod eftersom den är billig och snabb att utföra på lab då herbiciden lätt kan tillsättas i gröningsvattnet (Espeby, 2006). Problemet ligger istället i att förberedelserna inför testet tar lång tid. Frön av många ogräsarter går nämligen i frövila en tid

och kan därför inte uppodlas direkt, vilket gör att flera månader kan behövas från att resistens misstänks till att ett resultat kan fås.

För att fastställa target site-resistens är frötester en bra metod, men det ger ingen säker information om metabolisk resistens (Moss, 1999; Kaundun et al., 2010). Ökad metabolism uppträder oftast senare i plantans utveckling (Kaundun et al., 2010). Moss (1999) hävdar att krukttester därför är säkrare eftersom de bäst avspeglar vad som händer i fält, samt att plantorna hinner tillväxa så att resistens kan upptäckas oavsett mekanism.

Planttester: ”Syngenta Quick test” och ”Syngenta RISQ test” är två metoder där småplantor och blad kan samlas in direkt från fältet för analys. Det behövs därför inga frön och insamlingen kan ske under hösten så att resultatet kan tas fram i god tid innan vårbekämpningen. Syngenta Quick test är ett test där plantor planteras i krukor, medan Syngenta RISQ test är en metod där småplantor får växa på agar i petriskålar. Båda tester är snabba, men till skillnad från kruktestet, tar petriskålarna mindre plats eftersom de kan staplas ovanpå varandra (Kaundun et al., 2010).

Boutsalis (2001) skriver att resultatet från ett Syngenta Quick test kan presenteras inom 4 veckor från att provet har insamlats från fält, vilket gör att det är en mycket snabbare metod än frötester. Problemet med denna metod är att det inte finns några referensplantor att jämföra med. Det har visat sig att plantor i alla tillväxtstadium kan användas för testet, under förutsättning att de vegetativa delarna herbicidbehandlas. Boutsalis (2001) rekommenderar ändå att plantor i ett tidigare tillväxtstadium används, för att i god tid kunna sätta in en bekämpningsstrategi under samma odlingsäsong.

Fördelen med Syngenta Quick test är att även metabolisk resistens kan upptäckas, då plantorna hinner växa sig större. Syngenta RISQ test däremot visar ingen ökad metabolism, utan bara target site-resistens, enligt Kaundun et al. (2010). För att upptäcka ACCas- och ALS target site-resistens är metoden robust och tillförlitlig (Kaundun et al., 2010).

För att kunna se graden av resistens, t.ex. vid en ökad metabolism, är dos-respons-tester i krukor att föredra. Då testas ett antal doser och den koncentration som krävs för att bekämpa ogräset kan fastställas. Testet måste innefatta både lägre och högre doser än rekommenderat, för att visa utvecklingen från känslig till resistent (Moss, 1999).

Kan lantbrukaren utföra tester själv? Det kan tänkas enkelt för lantbrukaren att själv utföra ett test som Syngenta Quick test, men Powles (i personlig kommunikation med Boutsalis, angivet i litteratursammanställning av Boutsalis, 2001) rekommenderar det inte. Det har visat sig att lantbrukare oftast har ont om tid och tålamod för att utföra testet ordentligt, samt att de inte håller sig till den dos som rekommenderas. För att få rätt information om vilka verkningsmekanismer som förekommer bör också prover skickas in till ett lab.

Ett tillförlitligt test måste uppfylla vissa kriterier. Bland annat krävs en bra gröningsprocent, fröna/plantorna måste vara representativa och samlas in på rätt sätt. De ska inte vara onormalt känsliga eller okänsliga för herbiciden. En stor mängd småplantor/frön måste insamlas för att det ska ge ett säkrare resultat (Kaundun et al., 2010).

För att kunna bedöma vad försöksresultaten betyder är det viktigt att inkludera referenspopulationer, känsliga och resistent, att jämföra med. Även plantor som är delvis resistent borde tas med som referens (Moss, 1999).

I övrigt är det viktigt att utföra lämpliga statistiska analyser. Ett av de främsta problemen i ogräsforskning idag är användning av felaktiga analysmetoder av resultat (Onofri et al., 2009). Det krävs ett antal upprepningar för att säkerhetsställa ett bra resultat. Det är speciellt viktigt att använda rätt metoder när olika slags tester jämförs med varandra, för att minska risken för felbedömningar (Moss, 1999).

4. MATERIAL OCH METODER

Försöket följer en standardiserad frekvensmetod, ”Rothamsted Rapid Resistance Test (RRR-test)”, för att upptäcka resistens i renkavle (*Alopecurus myosuroides* Huds.). Vissa avvikelser förekommer, men testet baseras på ett protokoll utfärdat av Solvejg Mathiesen. Försöket är en del av ett större försök, ett ringtest, och utförs i petriskålar.

Tabell 2: ALOMY-populationer i försöket

Population	Land	Förväntad resistens
ID 85	Danmark	Känslig
ID 382	Danmark	Ökad metabolism
ID 692 (SWE9010)	Sverige	Ökad metabolism?
ID 693 (SWE9008)	Sverige	Ökad metabolism?
ID 697 (SWE9002)	Sverige	Ökad metabolism?
ID 698 (PELD07)	Storbritannien	Target site-resistens mot sulfometuron, förändrad metabolism mot fenoxaprop-P
ID 699 (NOTTS)	Storbritannien	Target site- resistens mot cycloxiidim

Tabell 3: Herbicider i försöket

Herbucid	Aktiv substans	Koncentration
Primera Super	Fenoxaprop-P	69 g/l
Focus Ultra	Cycloxiidim	100 g/l
Oust	Sulfometuron	750 g/kg
Stomp	Pendimetalin	400 g/l
+ Kontroll	-	-

4.1 Uppräkning av frön

Enligt försöksbeskrivningen ska 2 replikat av varje fröpopulation och herbucid utföras, men istället väljs 4 replikat uppdelat i 2 klimatskåp för att vara på den säkra sidan. Även 4 replikat för kontroll görs. Detta ger 20 petriskålar/fröpopulation, med 50 slumpmässigt utvalda frön i varje petriskål. Proverna uttas genom halvering för hand ned till provstorlek strax över 50 frön, sedan handräkning. Fröna läggs i påsar om 50 st frön.

4.2 Förberedelse av petriskålar

4 filterpapper placeras i varje petriskål, 3 cellulosa-filter och ett glasfiberfilter överst. Cellulosafiltren används för att hålla vatten och glasfiberfiltret för att rötterna ska ha svårare att tränga igenom (L. Åkerblom-Espeby, Sveriges Lantbruksuniversitet, personligt meddelande, april 2011). Petriskålarna är 90 mm i diameter och filtren ska vara större än skålarna p.g.a. tidigare försök där dessa förhållanden har förekommit. Skålarna märks med fröpopulation och namn på aktiv substans. En påse med 50 frön töms i varje petriskål och fördelas jämnt över ytan.

4.3 Beredning av herbicidlösningar

Herbicidlösningarna bereds enligt blandningsschemat i bilaga 1.

7 ml av varje herbucid appliceras i 28 petriskålar (4 replikat x 7 frösorser) och 7 ml av KNO_3 – lösningen appliceras i 28 petriskålar för kontroll (4 replikat x 7 frösorser).

Petriskålar placeras i staplar i genomskinliga polyeten-påsar, med herbicidblandningarna och replikaten separerade så att varje påse innehåller alla frö-ID, men bara en herbicid. En tom petriskål innehållande filterpapper placeras överst på varje stapel av petriskålar, så att det översta provet får samma andel ljus som resten av proverna. Påsarna försluts sedan med tejp.

4.4 Inkubation

Staplarna med petriskålar placeras i 2 klimatskåp (2 replikat i varje) som håller 17°C, 14 timmar/dag med ljusexponering. På natten, 10 timmar/natt ska skåpet hålla temperaturen 10°C, utan ljusexponering. Staplarna flyttas runt i klimatskåpet varje 1-2 dagar för att alla petriskålar ska få exakt samma miljöförutsättningar.

4.5 Avläsning

Efter ca två veckor (13 dagar i detta fall) sker avläsningen av försöket. Två metoder för avläsning utförs.

4.5.1 Visuell bedömning

Först görs en visuell bedömning av herbicidleden jämfört med kontrollen, där täckningsgraden av grönyta i procent jämfört med kontroll uppskattas. Bedömningen utförs av två personer för att jämföra skillnader i bedömning.

4.5.2 Frekvensräkning

Den andra metoden är att räkna antalet grodda frön i alla petriskålar av kontrollerna, samt antal skott längre än 1 cm. Antal skott längre än 1 cm räknas även i herbicidleden. Med hjälp av värdena för bedömningen på grobarheten (endast kontrolledet) och antal skott över 1 cm (alla led) räknas ett procentvärde fram för att kunna avgöra resistensgraden. Ett medelvärde av replikaten för respektive herbicid/kontroll av varje frö-ID används i uträkningarna.

För att kunna beräkna resistensgraden görs först statistiska test i Minitab. Detta för att kunna avgöra om medelvärden kan användas i beräkningarna och vid skapande av diagram, eller om det skiljer sig så pass mycket mellan klimatskåpen och replikaten att de måste bedömas separat (se resultat och diskussion för utförligare förklaring). För att se om det finns skillnader mellan klimatskåpen och replikaten görs två tester i Minitab; ”ANOVA One Way test, Tukey’s”, samt ett ”Two-sample T-test”.

Med hjälp av kontrollernas medelvärde för grobarhet och medelvärdet för antal frön med skott > 1 cm räknas sedan % av grodda frön med skott > 1 cm ut enligt formeln:

$$\frac{\text{Antal grodda frön med skott} > 1 \text{ cm}}{\text{Grobarhet, \%}} \cdot 100$$

% av grodda frön med skott > 1 cm hos kontrollerna sätts sedan i förhållande till herbicidbehandlingarna för att få fram tillväxten efter respektive behandling.

% reduktion i antal frön med skott > 1 cm, jämfört med kontroll, enligt formeln:

$$\% \text{ tillväxtreduktion} = \frac{\text{Antal frön med skott} > 1 \text{ cm i kontroll} - \text{antal frön med skott} > 1 \text{ cm i herbicidblandningar}}{\text{antal frön med skott} > 1 \text{ cm i kontroll}}$$

$$\% \text{ tillväxt} = 100 - \text{reduktion}$$

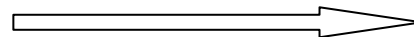
För bedömning av resistensgraden används en ordinalskala, "R-systemet", utfärdat av Stephen Moss. Skalan är från början gjord på tillväxtreduktion, men jag räknar om skalan till % tillväxt istället, eftersom jag tycker att det är lättare att jämföra resultaten på tillväxt istället för reduktion. Skalan ser annorlunda ut för respektive herbicid, eftersom skalan utformas efter det frö-ID som konstaterats som känslig standard för respektive herbicid.

Figur 1: Ordinalskala för resistensbedömning

S		R?	RR			RRR	
<i>S</i>	<i>S</i>	<i>1*</i>	<i>2*</i>	<i>3*</i>	<i>4*</i>	<i>5*</i>	
0%	X%	X%	X%	X%	X%	X%	100%

KÄNSLIG

ÖKANDE RESISTENS



S = S

Susceptible, vilket betyder känslig

1* = R?

Tidiga indikationer på att resistens kan utvecklas, kan minska herbicideffekten

2*/3* = RR

Resistens konstaterat, förmodligen minskad herbicideffekt

4*/5* = RRR

Resistens konstaterat, minskad herbicideffekt

4.6 Torrsubstans

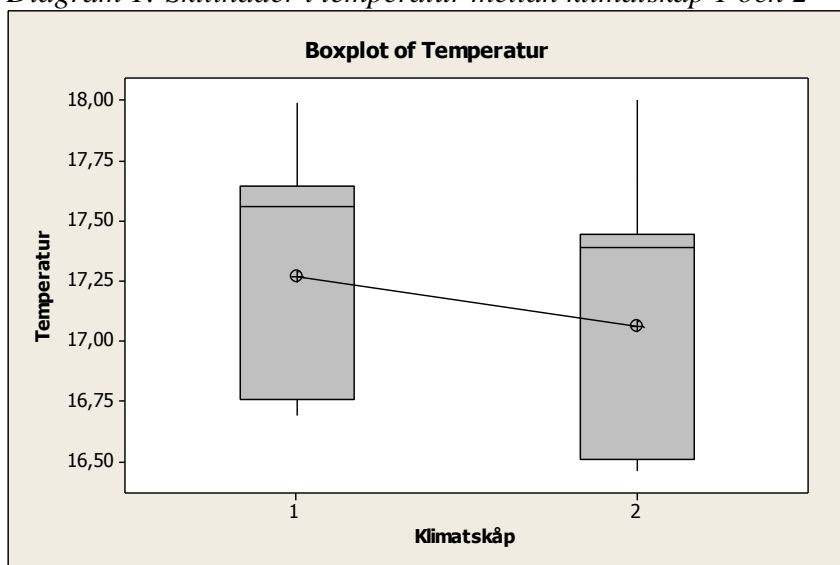
För att kunna avgöra om den visuella täckningsgraden av grönyta är en bra metod för resistensbedömning görs även ett torrsubstansstest att jämföra med. Biomassan för varje petriskål (inklusive frön) tas bort och läggs i aluminiumformar. Aluminiumformarna placeras sedan minst ett dygn i ett värmeskåp som sätts till 105 °C. En bestämning av frövikten görs även genom att räkna upp 200 frön av varje frönummer, så att vikten för 50 frön kan räknas ut. Dessa torkas sedan på samma sätt som biomassan från petriskålarna. Innan avläsningen stängs värmeskåpet av under en timmes tid. Innehållet i varje aluminiumform vägs sedan på en våg med 3 decimalers noggrannhet. Beräkningar görs sedan för att räkna ut procent biomassa i herbicidleden jämfört med kontrollleden.

5. RESULTAT

5.1 Klimatskåpen

För att se om temperaturen i klimatskåpen stämde överens med temperaturinställningarna gjordes en loggning av temperaturen. Petriskålarna sattes in i klimatskåpen den 14/4 och togs ut den 27/4. Tyvärr höll inte skåpen 10 °C på natten som det var inställt på, utan de höll en temperatur på strax under 17 °C. Tukey's test påvisade inga skillnader mellan klimatskåpen, men i diagrammet nedan ses att det ändå fanns måttliga skillnader. Se även bilaga 2 för diagram från respektive klimatskåp.

Diagram 1: Skillnader i temperatur mellan klimatskåp 1 och 2



5.2 Kontroll

I diagram 2 ses att grobarheten var bra för alla frö-ID, utom för ID 85 som hade en något sämre groningsprocent på 79,5. ID 85 hade även en lägre tillväxttakt än övriga frö-ID (se diagram 3).

Diagram 2: Grobarhet i % för kontrolledet

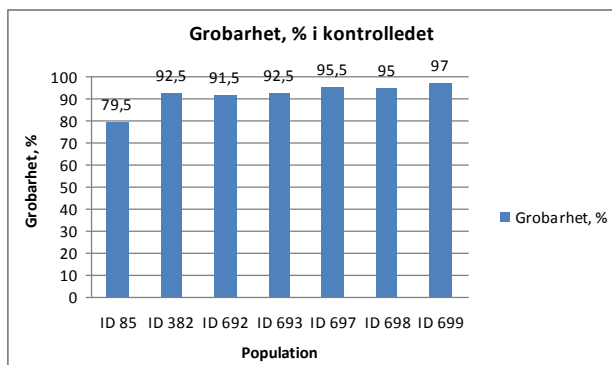
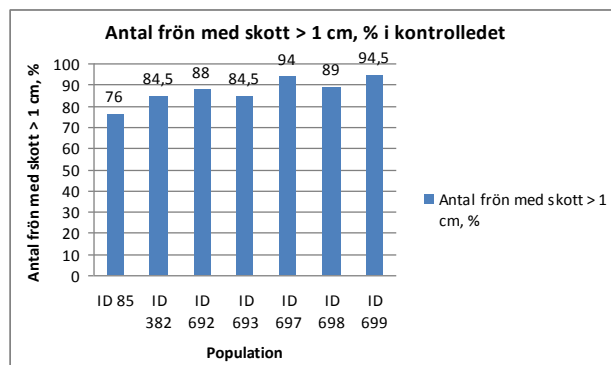
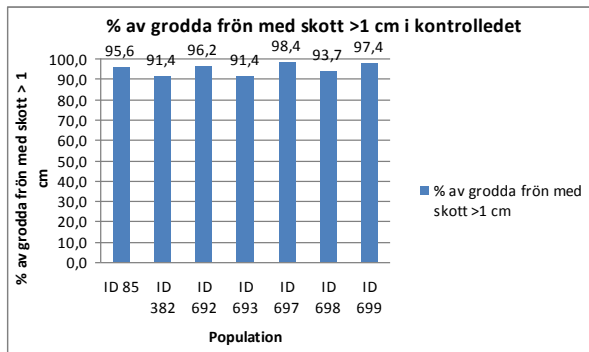


Diagram 3: Antal frön med skott > 1 cm i kontrolledet



En uträkning av andelen grodda frön med skott längre än 1 cm visar att alla frö-ID uppnådde minst 90 % (diagram 4). ID 697 hade den högsta procenten av grodda frön där skotten uppnått 1 cm eller mer, medan ID 382 respektive ID 693 hade lägst procent.

Diagram 4: % av grodda frön med skott > 1 cm i kontrolledet



5.3 Jämförelse av resultat mellan visuell bedömning och frekvensräkning

Behandlingen med fenoxaprop-P och sulfometuron fungerade inte som väntat. Frö-ID 85 angavs i försöksinstruktionen som känslig standardpopulation för samtliga herbicider (Tabell 2). Inget fröparti uppfyllde dock det krav på stor gröningsreduktion i behandlade led som ställs på en känslig standard, för vare sig fenoxaprop-P eller sulfometuron. Ingen känslig standard fanns därmed för dessa herbicider, och därför kunde inte resistens bedömas utifrån frekvensmetoden i dessa led.

Resultatet i den visuella bedömningen och frekvensmetoden för fenoxaprop-P och sulfometuron skiljde sig stort, både från varandra och från de förväntade resultaten för de olika fröpartierna (se diagram 5 och 9 för fenoxaprop-P och 7 och 11 för sulfometuron). Den visuella graderingen av grönyta visade dock en förväntad skillnad mellan fröna, med störst grönyta för det känt sulfometuron-resistenta frö-ID 698. Denna relativt större motståndskraft mot herbiciden syntes inte tydligt i frekvenstestet, så här tillförde det visuella testet extra information.

Resultatet av cykloimidbehandlingen redovisas i diagram 6 och 10. De visar ett tydligt mönster av överensstämmelse mellan resultaten i den visuella metoden och i frekvensmetoden för de ingående fröpartierna. Utfallet för de olika frö-ID var dessutom i linje med det förväntade i detta led. Diagram 8 och 12 för pendimetalin visar på ett liknande mönster, men inte fullt lika tydligt som behandlingen med cykloimid. Här kan bedömningen i den visuella metoden ha tillfört information av betydelse om skottens tillväxtkraft.

Jämförelsen mellan två olika personers sätt att göra den visuella graderingen visade inga betydande skillnader i detta försök. En liten skillnad i bedömning för ID 692 och 693 i pendimetalinbehandlingen redovisas i diagram 8.

Diagram 5-8: Visuell gradering av tillväxt/täckningsgrad för respektive herbicid, jämfört med led för kontroll

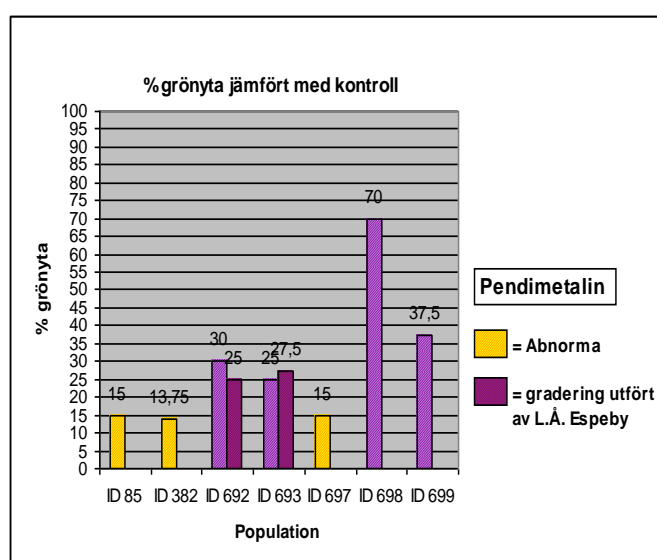
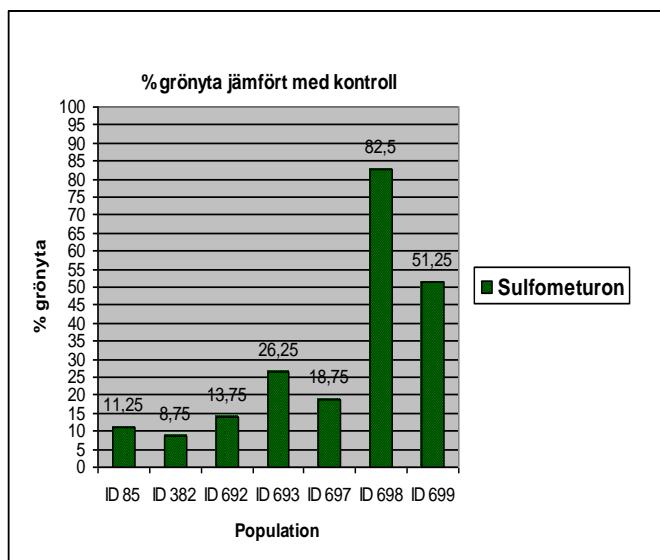
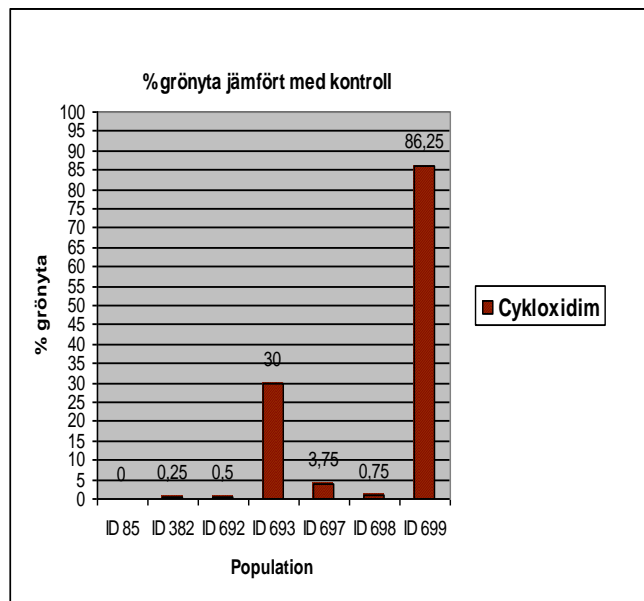
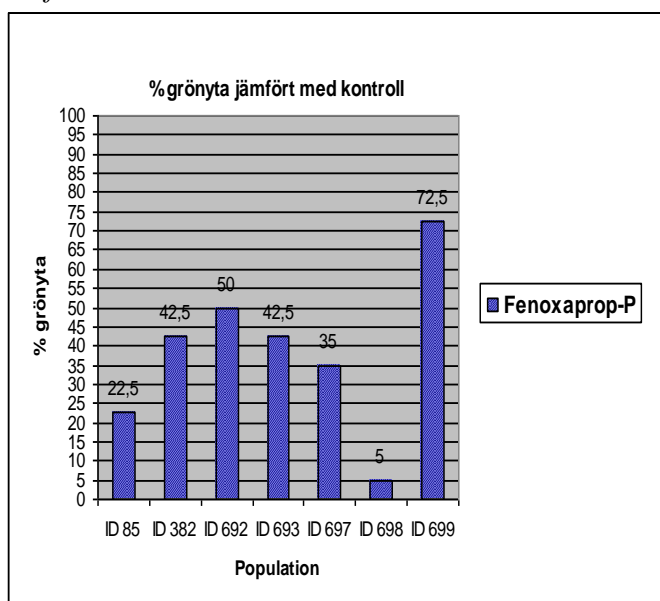
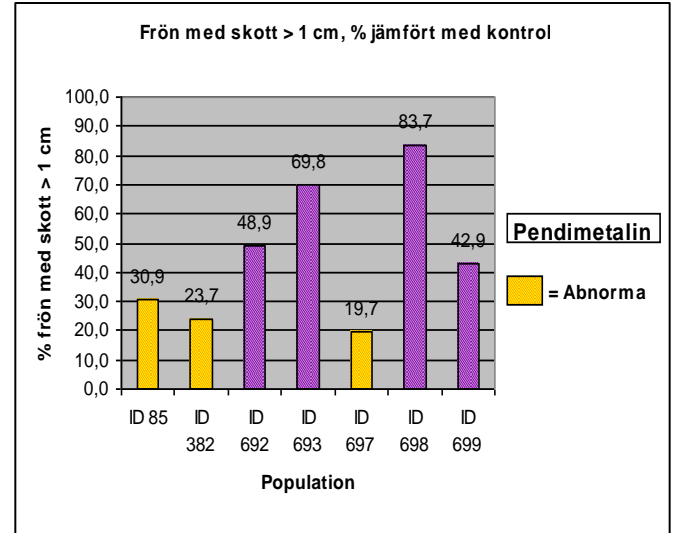
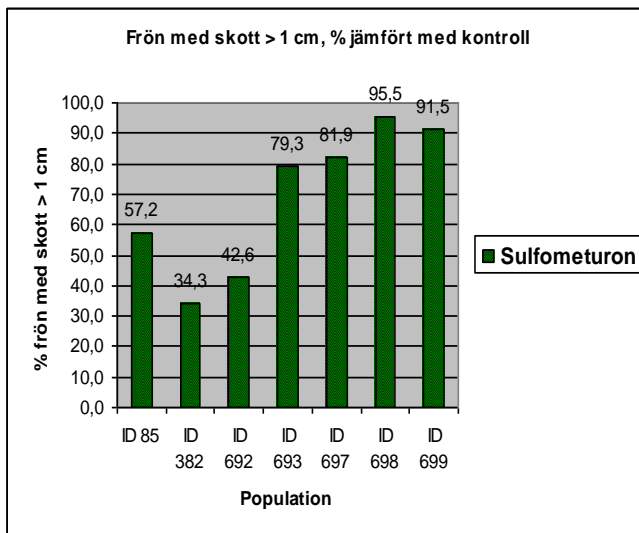
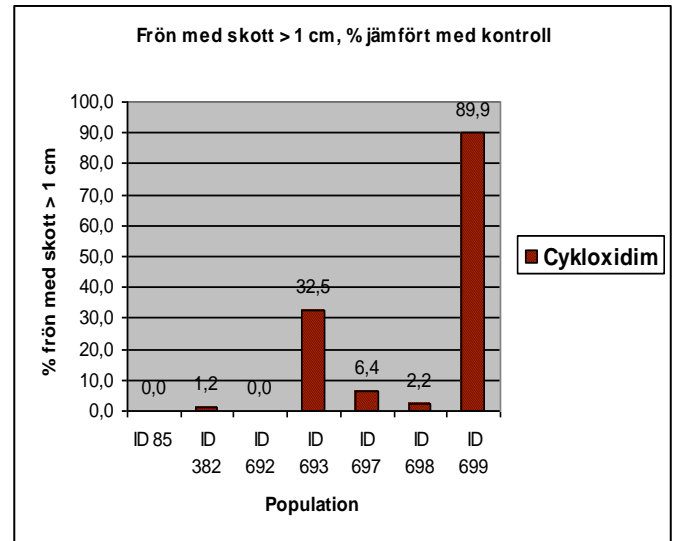
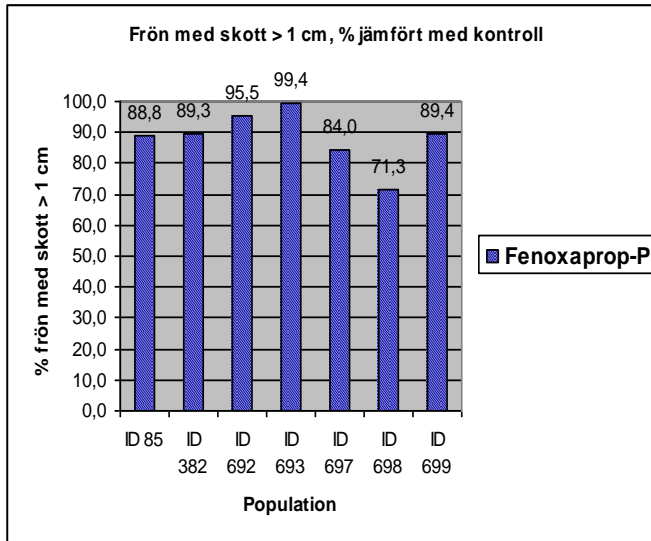


Diagram 9-12: Frekvensmetoden: frön med skott > 1 cm, jämfört med kontroll



För pendimetalin skiljer sig resultatet till viss del mellan den visuella bedömningen och frekvensräkningen. I leden med abnorma skott överskattas resistensgraden i frekvensmetoden om de abnorma skotten medräknas, medan den visuella bedömningen mer entydigt visar på en känslighet mot herbiciden (se exempel nedan).

Bild 1: ID 85 behandlat med pendimetalin. Många skott precis över 1 cm långa, men i övrigt korta och mycket tjocka = abnorma. 15 % täckning enligt den visuella bedömningen och 30,9 % skott över 1 cm enligt frekvensmetoden. Frekvensmetoden överskattar, dessa skott är känsliga.

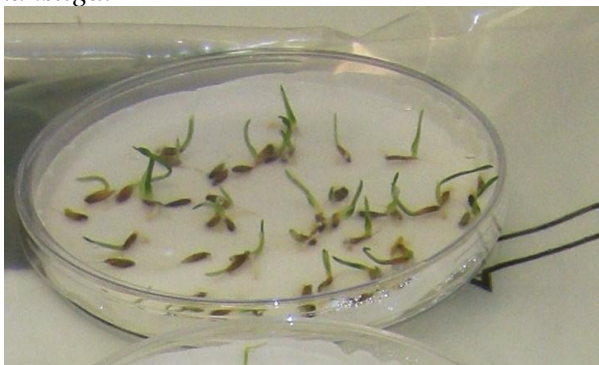


Bild 2: ID 692 behandlat med sulfometuron. Många skott precis över 1 cm långa, men mycket tunna och mer "normala". 13,75 % täckning enligt den visuella bedömningen och 42,6 % skott över 1 cm enligt frekvensmetoden. Den visuella bedömningen underskattar, dessa skott är resistenta och kommer troligen att utvecklas till reproduktiva plantor.



5.4 Resultat från frekvensmetoden

Ingen känslig standard fanns för fenoxaprop-P eller sulfometuron, därför kunde inte resistens graderas enligt denna metod för dessa led.

För cykloksidim togs följande skala för resistensbedömning fram, efter den känsliga standarden ID 85:

S		R?	RR			RRR	
<i>S</i>	<i>S</i>	<i>I*</i>	<i>2*</i>	<i>3*</i>	<i>4*</i>	<i>5*</i>	
0%	10%	20 %	40%	60%	80%	100%	

KÄNSLIG ÖKANDE RESISTENS

ID 85 kunde inte användas som känslig standard för pendimetalin eftersom groningen var för hög i herbicidledet med pendimetalinbehandling. Valet stod då mellan ID 382 och ID 697, men eftersom ID 697 skiljde sig stort mellan klimatskåpen var ID 382 ett säkrare val. För pendimetalin togs alltså följande skala för resistensbedömning fram, efter den känsliga standarden ID 382:

S		R?	RR			RRR	
<i>S</i>	<i>S</i>	<i>I*</i>	<i>2*</i>	<i>3*</i>	<i>4*</i>	<i>5*</i>	
0%	19,1%	26,5%	41,2%	55,9%	70,6%	85,3%	100%

KÄNSLIG ÖKANDE RESISTENS

Resultatet sammanfattas i följande tabell:

Tabell 4: Resistensgrad enligt frekvensmetoden

Population	Fenoxaprop-P (ACCas target site/ökad metabolism)	Cykloxiidim (ACCas target site)	Sulfometuron (ALS target site)	Pendimetalin (Ökad metabolism)
ID 85	-	S	-	R?
ID 382	-	S	-	S
ID 692	-	S	-	RR
ID 693	-	RR	-	RR
ID 697	-	S	-	S
ID 698	-	S	-	RRR
ID 699	-	RRR	-	RR

ID 85 visade stor tillväxt i den visuella bedömningen för alla led utom cykloxiidim. Därför stämde inte förväntningarna på att denna skulle vara känslig standard för alla herbicider.

ID 382 som förväntades vara metabolisk resistent påvisade istället en hög känslighet mot pendimetalin, varför den användes som känslig standard för uträkningar av resistensskalan.

Resultatet för ID 692 stämde väl överens med förväntningarna. ID 692 påvisade en metabolisk resistens.

ID 693 hade som förväntat en metabolisk resistens, men även ACCas target site-resistens förekom.

ID 697 var känslig mot både cykloxiidim och pendimetalin. Den hade därför kunnat användas som känslig standard för pendimetalin, om det inte hade varit alltför stora skillnader mellan klimatskåp 1 och 2 just för detta frö-ID.

ID 698 hade som förväntat en metabolisk resistens mot pendimetalin, men om det var en förändrad metabolism även mot fenoxaprop-P kunde inte fastställas. ALS target site-resistens kunde heller inte avgöras med frekvensmetoden eftersom försöket inte lyckades för sulfometuron, men den visuella graderingen visar dock på en hög grönyta i jämförelse med övriga led.

Hos ID 699 kunde, med säkerhet, target site-resistens mot cycloxiidim fastställas, men även en metabolisk resistens förekom.

6. DISKUSSION

Groningsprocenten var i detta försök hög, utom för ID 85. För ett tillförlitligt försök krävs en hög groningsprocent på minst 80 % för den känsliga standardens kontroll. ID 85, som förväntades vara känslig, hade en groningsprocent på endast 79,5 %, alltså på gränsen till tillåtlig, och som därmed avvek från övriga frönummer. Detta kan ha påverkat resultatet.

För att resultatet ska kunna användas i frekvensmetoden måste en känslig standard finnas i försöket. Försöket lyckades inte i behandlingen med fenoxaprop-P och sulfometuron eftersom den förväntade känsliga ID 85 påvisade resistens. Något gick alltså fel. En förklaring kan vara att fel koncentrationer har tillblandats vid beredningen av herbiciderna. Primera Super (fenoxaprop-P) var ett mycket besvärligt preparat att pipettera eftersom det var trögflytande. Sulfometuron däremot vägdes upp mycket noggrant och exakt, men att behandlingen inte fungerade kan i det här fallet ha berott på den stora volymen lösning som tillreddes. En stor mängd lösning kan ha resulterat i en otillräcklig omrörning och därför en felaktig dos vid pipetteringen.

En annan orsak till försöksresultatets avvikelse jämfört med förväntat resultat kan ha berott på avläsningstidpunkten. Tillväxten skedde snabbare än den borde ha gjort eftersom klimatskåpen inte höll rätt temperatur. Den felaktiga temperaturen kan ha påverkat groningen, och framförallt tillväxttakten. För att fröna ska gro bra behövs en större temperaturskillnad som ”triggar igång” groningen (L. Åkerblom-Espeby, Sveriges Lantbruksuniversitet, personligt meddelande, april 2011). Den snabba tillväxten kan ha resulterat i att avläsningen gjordes för sent för vissa led, när skillnader som eventuellt hade kunnat ses i ett tidigare skede utjämnades. Hade en tidigare avläsning gjorts, hade det troligtvis resulterat i färre skott över 1 centimeters längd, samt en annan bedömning av resistensnivån. En anledning till att det här ringtestet utförs är för att utvärdera om det verkligen behövs de absolut bästa materialen, t.ex. bra klimatskåp. Om bra klimatskåp inte används måste större noggrannhet för avläsningstidpunkt ske.

Frekvensmetoden är en bra metod på det viset att den är känslig för den sortens fel som kan ha gjorts i försöket och att den tydligt visar när resultatet blir felaktigt. En känslig standard måste som sagt bekräfta resultatet.

Den visuella bedömningen och frekvensmetoden överensstämmer ofta med varandra, men kan också ge skilda typer av information om herbicidens verkan. Frekvensmetoden visar andelen frön som klarar att gro trots närvaro av herbicid. Den är användbar för att påvisa resistens mot herbicider som hämmar groning och den tidiga tillväxten, oavsett resistensmekanism.

Om de abnorma skotten, som uppträdde i flera av petriskålarna behandlade med pendimetalin, räknas som grodda i frekvensmetoden, finns en risk att resistensgraden överskattas. Dessa plantor skulle med största sannolikhet inte kunna utvecklas till reproduktiva plantor eftersom tillväxten har tryckts tillbaka så pass starkt. Känslighet mot pendimetalin hos dessa frö-ID kan bara antas och en visuell gradering är därför bättre i ett senare stadium eftersom det ger en indikation på herbicidens verkliga påverkan på plantans utveckling. Som tidigare beskrivet är en serie olika doser med en visuell bedömning den bästa metoden för att se hur metabolisk resistens utvecklas, p.g.a. att metabolisk resistens uppträder mer smygande. I ett senare stadium kan en visuell gradering dessutom vara mycket snabbare och effektivare än metoden med att räkna alla frön som lyckats gro. Nackdelen med en visuell gradering är att det är lätt att göra felaktiga bedömningar om inte vana för utförandet finns.

Vid ett avgörande om resistens förekommer eller inte, behövs en bedömningskala/rankning även för den visuella bedömningen. Samma skala som används för frekvensmetoden kan inte användas för den visuella.

För att jämföra med den visuella bedömningen gjordes även ett torrsubstanstest för att avgöra den faktiska biomassan. Försöket fungerade mindre bra då frövikten tog upp en alldeles för stor del av biomassan. Exempel: Ett prov visade 5 % grönyta genom den visuella bedömningen, men visade 66 % biomassa i torrsubstansförsöket, jämfört med obehandlat led. Av att döma fotona som togs kan 66 % aldrig stämma eftersom tillväxten var väldigt låg i detta prov. När tillväxten är så pass låg är frövikten fortfarande stor eftersom groddarna inte har gjort av med all energi i fröna ännu. Genom att räkna bort en faktor för ogrodda frön kunde överensstämmelsen mellan vägd biomassa och visuell bedömning av biomassan förbättras. Denna del av försöket var dock främst orienterande, och analyserades och redovisas inte närmare i denna studie.

7. SLUTSATSER

Försöksresultaten överensstämde med förväntningarna på resistensnivå i fröproverna mot två av de ingående herbiciderna, cycloxidim och pendimetalin. Mot de två andra herbiciderna, fenoxaprop-P och sulfometuron, avvek resultaten mot de förväntade. Detta kan ha berott på labfel i försöket, eller andra faktorer. Testet skulle därför behöva upprepas för att kunna utesluta eventuella labfel. Jag väntar med spänning på att se de övriga resultaten i ringtestet, för att se om andra lab har fått samma resultat, eller resultat mer överensstämmande med förväntningarna.

En annan möjlig slutsats är att om frekvensmetoden ska vara robust för variation i temperaturen under groningen, d.v.s. kunna utföras även av laboratorier utan tillgång till klimatstyrda groningsskåp, måste stor noggrannhet läggas vid att hitta rätt avläsningstidpunkt vid varje testtillfälle.

Tillägget av en visuell gradering gav i några fall extra information, och eftersom den var snabb att utföra och kunde utföras med små avvikelser mellan olika avläsare, kan den vara ett värdefullt tillägg till frekvensmetoden, särskilt i lab där möjligheten till temperaturstyrning är begränsad .

Genom detta arbete har jag kommit fram till att det verkar vara ett problem att hitta en robust metod för att upptäcka metabolisk resistens, men att det finns bra tester för target site-resistens. Som tidigare nämnt finns det tester där halten av enzymet GST bestäms, men som fortfarande är en väldigt osäker metod, och det är oklart om metabolisk resistens alltid kan kopplas till detta. Ingen enskild test är den bästa, utan för att få en helhetsbild över resistenssituationen, med exakta mekanismer, behövs både planttester och frötester.

8. REFERENSER

- Anderberg, A., 2000, Den virtuella floran,
<http://linnaeus.nrm.se/flora/mono/poa/alope/alopmyo.html>, använd 2011-04-20.
- Andersson, L., 2010, Gräsogräs – biologi och kontroll,
<http://www.greppa.nu/download/18.1c0ae76117773233f780003566/C7+Gräsogräs.pdf>
- Arvidsson, T., Fogelfors, B.M., & Fogelfors, H. 1999, Herbicidresistens hos ogräs, FAKTA Jordbruk, Nr 3.
- Baerson, S.R., Rodriguez, D.J., Tran, M., Feng, Y., Biest, N.A. & Dill, G.M., 2002, Glyphosate-Resistant Goosegrass. Identification of a Mutation in the Target Enzyme 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase, *Plant Physiology*, Volume 129: 1265-1275.
- BASF Crop Protection Sverige, Focus Ultra,
http://www.agro.basf.se/se/deploy/media/se/product_files/produkth_ndbog_2010/Focus_Ultra.pdf, använd 2011-04-20.
- BASF Crop Protection Sverige, Stomp,
http://www.agro.basf.se/se/deploy/media/se/product_files/produkth_ndbog_2010/Stomp.pdf, använd 2011-04-20.
- Bayer CropScience, 2011, Event Super,
http://www.bayercropscience.se/fileadmin/uploads/Produktkatalog_2011/event-super.pdf, använd 2011-04-20.
- Bond W., Davies, G., & Turner, R., 2007, The biology and non-chemical control of black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.), HDRA the organic organisation, oktober 2007.
- Boutsalis, P., 2001, Syngenta Quick-Test: A Rapid Whole-Plant Test for Herbicide Resistance, *Weed Technology*, Volume 15: 257-263.
- Cocker, K.M., Moss, S.R. & Coleman, J.O.D., 1999, Multiple Mechanisms of Resistance to Fenoxaprop-P-Ethyl in United Kingdom and Other European Populations of Herbicide-Resistant *Alopecurus myosuroides* (Black-Grass), *Pesticide Biochemistry and Physiology* 65, 169-180.
- Cox, C., 2002, Herbicide Factsheet: Sulfometuron Methyl (Oust), *Journal of pesticide reform/Winter 2002*, vol. 22, nr 4.
- CropLife Australia, 2010, Herbicide Resistance Management Strategies,
www.croplifeaustralia.org.au, använd 2011-05-20.
- Cummins, I., Moss, S., Cole, D.J. & Edwards R., 1997, Glutathione Transferases in Herbicide-Resistant and Herbicide-Susceptible Black-grass (*Alopecurus myosuroides*), *Pestic. Sci.*, 51, 244-250.

- Délaye, C., Gardin, J.A.C., Boucansaud, K., Chauvel, B. & Petit, C., 2011, Non-target-site-based resistance should be the centre of attention for herbicide resistance research: *Alopecurus myosuroides* as an illustration, *Weed Research*, 51, 433-437.
- Délye C., Menchari, Y., Guillemin, J-P., Matějček, A., Michel, S., Camilleri, C. & Chauvel, B., 2007, Status of black grass (*Alopecurus myosuroides*) resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in France, *Weed Research* 47, 95-105.
- Den virtuella floran, <http://linnaeus.nrm.se/flora/mono/poa/alope/aloemyo.html>, använd 2011-04-15.
- Dow AgroSciences, Pendimethalin 500 EC, http://www.dowagro.com/PublishedLiterature/dh_0038/0901b80380038df8.pdf?filepath=/011-10138.pdf&fromPage=GetDoc, använd 2011-04-20.
- DuPont, 2009, Oust XP herbicide. http://www2.dupont.com/Production_Agriculture/en_US/label_msds_info/labels/SL-1444.pdf, använd 2011-04-20.
- Espeby, L.Å., 2010, Within-species Variation in Grass Weeds in Sweden, Doctoral Thesis No. 2010:35, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, s.34.
- Espeby, L.Å., L., & Fogelfors, H., 2006, Meddelande från södra jordbruksförsöksdistriktet: Resistens och variation i tolerans mot herbicider hos tre svenska gräsogräs, Rapport från växtodlings- och växtskydds dagar i Växjö, Södra Jordbruksförsöksdistriktet, nr 59.
- Fogelfors, H., Sveriges Lantbruksuniversitet, <http://ograsradgivaren.slu.se/>, använd 2011-07-31.
- Gardner, S.H., Agrawal, A., Gressel, J. & Mangel, M., 1999, Strategies to Delay the Evolution of Resistance in Pests: Dose Rotations and Induced Plant Defences, *Aspects of Applied Biology*, 53, 1999.
- Hallqvist, H., 2011, Undersökning av herbicidresistens hos renkavle 2010, Ogräsbrev, Jordbruksverket, Nr 4.
- Hallqvist, H., 2010, Undersökning av herbicidresistens hos renkavle 2009, Ogräsbrev, Jordbruksverket, Nr 1.
- Heap, I., <http://www.weedscience.org/>, använd 2011-05-09.
- Heap, I., <http://www.weedscience.org/ACCCaseTable.htm>, använd 2011-05-26.
- HRAC, Guideline to the Management of Herbicide Resistance, <http://hracglobal.com/Publications/ManagementofHerbicideResistance/tabid/225/Default.aspx>, använd 2011-05-19.

- Kaundun, S.S., Hutchings, S-J., Dale, R.P., Bailly, G.C. & Glanfield, P., 2010, Syngenta "RISQ" test: a novel in-season method for detecting resistance to post-emergence ACCase and ALS inhibitor herbicides in grass weeds, *Weed Research*, 2011.
- Kemikalieinspektionen, 2010, Försålda kvantiteter av bekämpningsmedel 2009, http://www.kemi.se/upload/trycksaker/pdf/statistik/forsalda_bkm_2009.pdf, använd 2011-05-20.
- Kemikalieinspektionen, 2008, Stomp SC, <http://apps.kemi.se/bkmregoff/>, använd 2011-04-20.
- Kemikalieinspektionen, 1997, Cykloxidim, <http://apps.kemi.se/bkmregoff/Bkmblad/Cyklox.pdf>, använd 2011-04-20.
- Kemikalieinspektionen, 1997, Fenoxaprop-P, <http://apps.kemi.se/bkmregoff/Bkmblad/Fenoxapr.pdf>, använd 2011-04-20.
- Marshall, R. & Moss, S.R., 2008, Characterisation and molecular basis of ALS-inhibitor resistance in the grass weed *Alopecurus myosuroides*, *Weed Research* 48, 439-447.
- Moss, S.R., 2003, Herbicide resistance in weeds: Current status in Europe and guidelines for management, *Pesticide Outlook*, augusti 2003.
- Moss, S.R., 2002, Herbicide-Resistant Weeds, *Weed Management handbook*, 9th edition, edited by Robert E.L. Naylor, Blackwell Publishing, kapitel 11, s 225-252.
- Moss, S.R., 1999, Detecting Herbicide Resistance, <http://www.hracglobal.com/Publications/DetectingHerbicideResistance/tabid/229/Default.aspx>, använd 2011-05-19.
- Onofri, A., Carbonell, E.A., Piepho, H-P., Mortimer, A.M. & Cousens, R.D., 2009, Current statistical issues in *Weed Research*, *Weed Research* 50, 5-24.
- Prather, T.S., Ditomaso, J.M. & Holt, J.S., 2000, *Herbicide Resistance: Definition and Management Strategies*, University of California, Publication 8012.
- Reade, J.P.H. & Cobb, A.H., 2002, *Herbicides: Modes of Action and Metabolism*, *Weed Management handbook*, 9th edition, edited by Robert E.L. Naylor, Blackwell Publishing, kapitel 8 s 134-170.
- Reade, J.P.H. & Cobb, A.H., 1999, Glutathione S-transferases in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.): Properties and involvement in herbicide resistance, *Pestic. Sci.*, 55, 349-351.
- Sjödahl, S., 2005, Resistensnivå i svensk renkavle mot två viktiga gramnicider, Examensarbeten/Seminarieuppsatser 77, Institutionen för ekologi och växtproduktionslära, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala.
- Wellander, P., 2009, Plogen – ett vapen mot resistens, *Jordbruksaktuellt*, 2009-08-06.
- Wikström, L., 2010, Ökande problem med renkavle, *Lantbrukets affärer*, 2010-03-25.

WRAG guidelines, 2003, Managing and preventing herbicide resistance in weeds, HGCA, 2003.

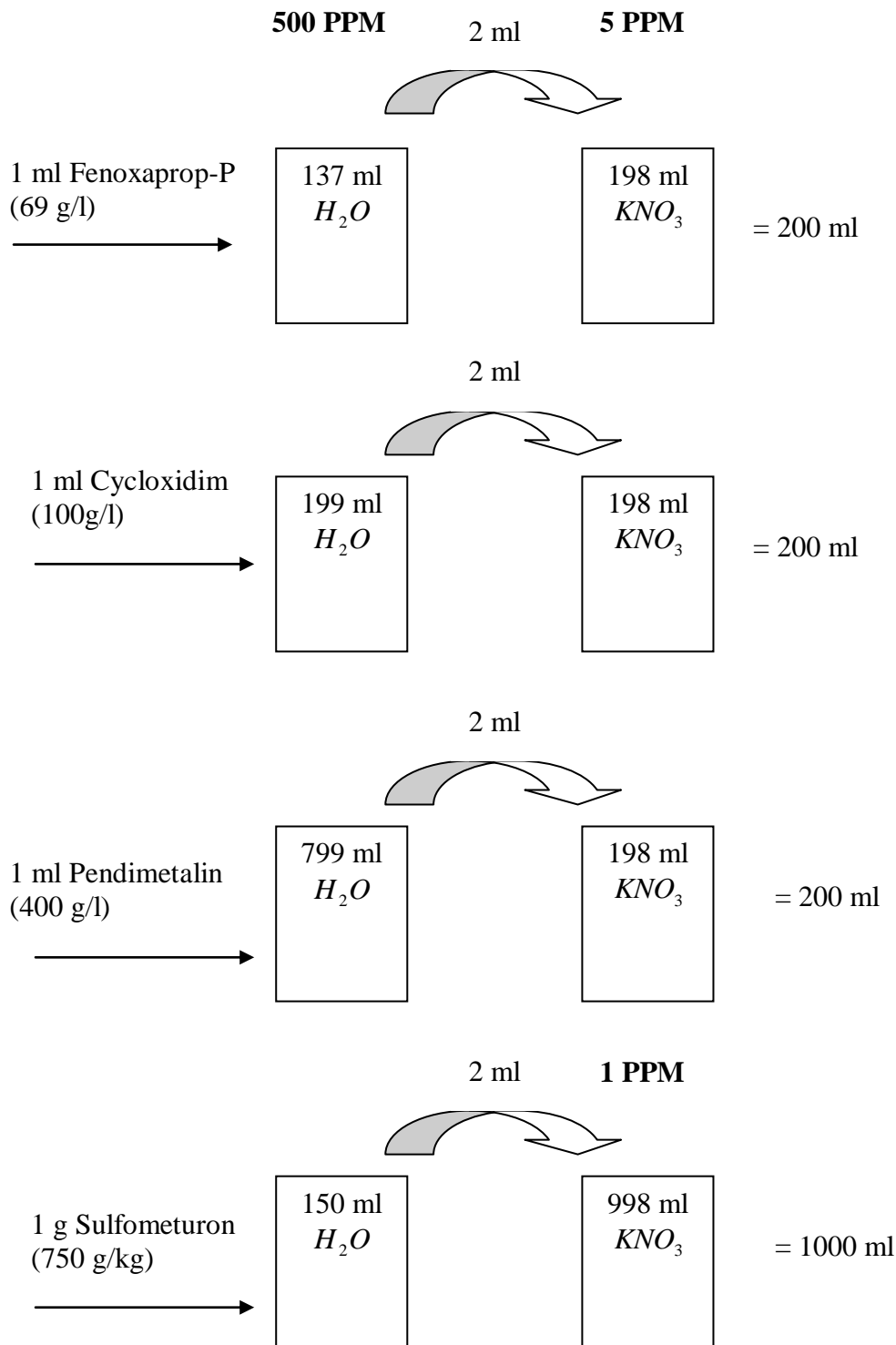
Personliga meddelanden

L. Åkerblom-Espeby, 2011, forskare inom ogräsbiologi & ogräsreglering, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala, liv.akerblom.espeby@slu.se.

BILAGOR

Bilaga 1: Blandningsschema av herbicidlösningar

Vätskan som används i blandningarna är i första steget avjoniserat vatten, och i andra steget kaliumnitratlösning (2 g/l). Andra bägaren (5 PPM respektive 1 PPM) ska innehålla 198 ml KNO_3 (utom för sulfometuron där 998 ml tillsätts). Sedan appliceras 2 ml av lösningen från första bägaren (500 PPM) så att den totala mängden blir 200 ml i andra bägaren (utom för sulfometuron, där lösningen blir 1000 ml).



Bilaga 2: Skottlängd i petriskålar med herbicidbehandlingar, klimatskåp 1 och 2.

Diagram B1: Klimatskåp 1

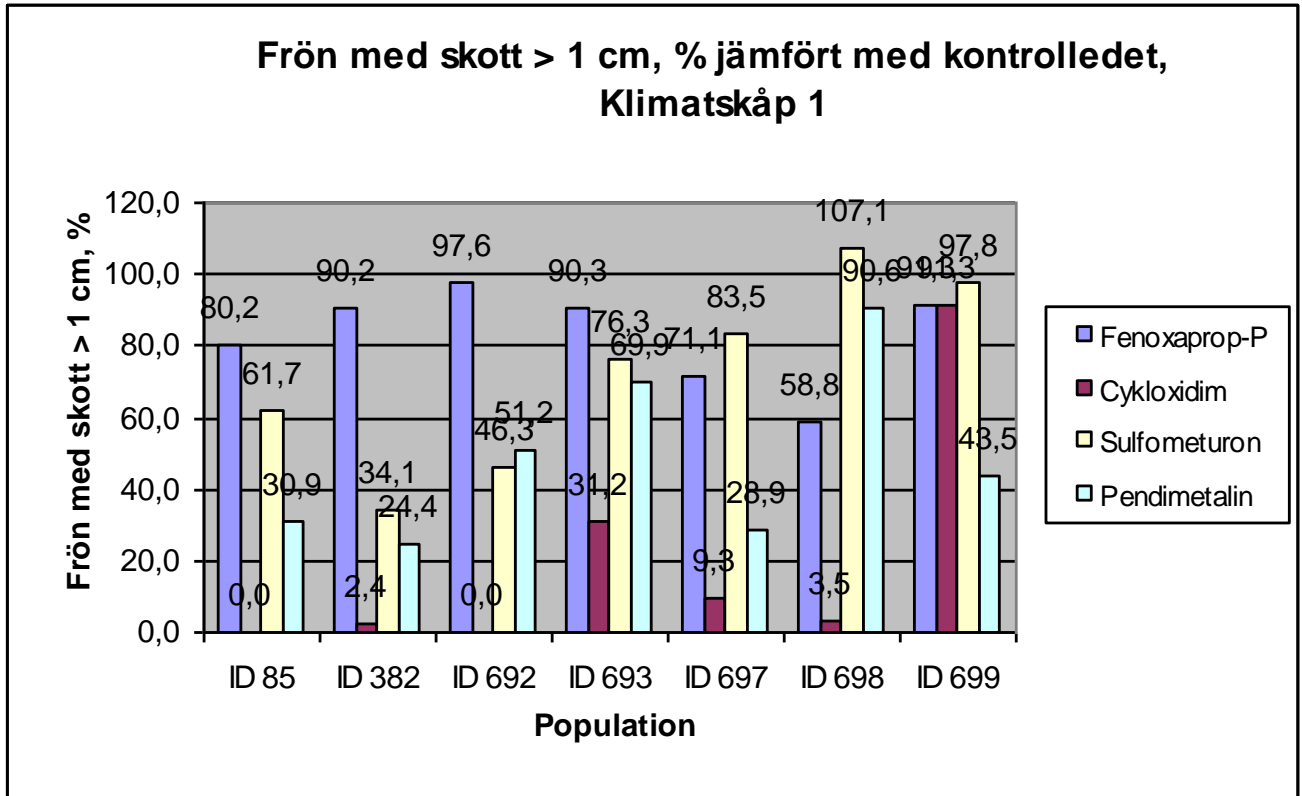


Diagram B2: Klimatskåp 2

