

Chundelka metlice s rezistencí k inhibitorům ALS – příčiny selekce rezistentních populací

(*Silky bent-grass resistant to ALS inhibitors – causes of resistant populations selection*)

Klemová Zuzana¹, Svačinová Ivana¹, Klem Karel^{1,2}, Jagošová Lenka¹, Matušinsky Pavel¹

¹Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, Kroměříž

²Ústav systémové biologie a ekologie AVČR, v.v.i., Na Sádkách 7, České Budějovice

Souhrn

Chundelka metlice (*Apera spica-venti*) je jednoletá, ozimá rostlina z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*), která zapleveluje převážně ozimé plodiny. Cílem této práce bylo vyhodnocení vlivu aplikace jednotlivých skupin herbicidů, jejich dávků, vzájemných kombinací a použití společně s adjuvanty na selekci rezistentních biotypů chundelky metlice v populaci s přirozeným výskytem mutace na pozici Pro¹⁹⁷. Z výsledků vyplývá, že vzniku rezistentních populací plevelů lze předejít jednak používáním kombinovaných herbicidů, nebo takovou strategií ochrany, kdy nedochází k opakovaným aplikacím přípravků se stejným mechanismem účinku.

Klíčová slova: acetolaktátsyntetáza, rezistence k herbicidům, plevel v obilovinách

Summary

Silky bent-grass (*Apera spica-venti*) is an annual, winter plant of the grass family *Poaceae*, which affect mainly winter crops. The aim of this work was to assess effects of application of individual herbicide groups, their doses, combinations and use with adjuvants on the selection of resistant biotypes of silky bent-grass in the population with natural occurrence of mutation on position Pro¹⁹⁷. Our results show that the emergence of resistant weed populations can be avoided either using combined herbicides or such a protection strategy when products with the same action mode are not applied repeatedly.

Keywords: acetolactate synthase, herbicide resistance, weed in cereals

Úvod

Lidská společnost se vyvinula díky schopnosti opakovat osvědčené kroky. V novodobém zemědělství to například znamená, že genotyp (odrůda), který dosáhl vysokého výnosu, se pěstuje opakovaně i v dalších letech. Jestliže herbicidní ochrana poskytuje vysokou účinnost, používá se velmi často stejný přípravek, nebo herbicid se stejným mechanismem účinku i několik let po sobě. Ovšem škodlivé organismy, včetně plevelů, vykazují značnou rozmanitost a schopnost adaptovat se na vzniklé podmínky tím lépe, čím častěji se tyto podmínky opakují. Tato schopnost přizpůsobení je jednou z hlavních příčin vzniku a rozšiřování rezistence k herbicidům. I v populacích vysoce citlivých druhů se přirozeně vyskytují jedinci s pozměněnou genetickou informací (spontánní mutací), kteří jsou nositeli rezistence k určitému typu herbicidů. Genetický základ rezistence znamená, že plevel rezistentní k danému herbicidu mohou předávat tento znak následujícím generacím. Plevel se adaptují nebo selektují velmi rychle především tehdy, pokud existuje trvalý a jednostranný selekční tlak, kterým může být právě dlouhodobé používání herbicidů se stejným mechanismem účinku.

Herbicidy se odlišují v účinnosti a reziduálním působení. Látky s vyšší účinností obecně vytvářejí silnější selekční tlak než herbicidy, které vykazují nižší účinnost. Podobně také dlouhé reziduální působení prodlužuje selekční působení herbicidu. Nové typy přípravků, které vykazují za standardních podmínek vysokou účinnost a současně působí v jednom nebo malém počtu vazebných míst, jsou proto značně náchylné k selekci rezistentních populací, která je dále podporována nepříznivými

podmínkami v době aplikace. V praxi rozlišujeme dva základní mechanismy rezistence k herbicidům. Tzv. metabolická rezistence znamená, že herbicid je v rostlinách degradován dříve, než dosáhne místa účinku a způsobí poškození rostlin. Vznik tohoto typu rezistence vyžaduje obvykle složitější změnu genetické informace, jejímž výsledkem je vznik metabolických drah umožňujících rychlé odbourávání účinné látky v rostlině. Naproti tomu rezistence v cílovém místě působení herbicidu představuje změnu vazebného místa enzymu tak, že herbicid nemůže být na tomto místě poután. Z pohledu selekce na rezistenci jsou rizikové především herbicidy, působící pouze v jednom vazebném místě. Typickým příkladem rezistence v cílovém místě působení herbicidu je rezistence k inhibitorům acetolaktátsyntázy (inhibitory ALS).

Herbicidy s mechanismem účinku založeném na inhibici acetolaktátsyntázy (ALS), se začaly používat od roku 1982. V současné době jsou nejpoužívanější skupinou herbicidů a zprávy o rezistenci k této skupině herbicidů se objevily již v roce 1987 z USA, tedy pouhých pět let po uvedení komerčních sulfonylmočoviny na trh. Další případy rychle přibývaly a už v roce 2007 bylo popsáno 95 různých druhů plevelů rezistentních k ALS-inhibitorům (Yu, 2007).

Acetolaktátsyntetáza (ALS) je enzym katalyzující první krok v biosyntéze aminokyselin valinu, leucinu a isoleucinu. Tento enzym je také cílovým místem pro skupinu ALS-inhibujících herbicidů zahrnující sulfonylmočoviny, imidazolinony, triazolopyrimidiny, pyrimidinyl(thio)benzoáty a sulfonylamino-karbo-nyltriazolinony (Yu, 2008). Přítomnost molekul účinných látek

těchto herbicidů v rostlinném systému ALS enzym inaktivuje, díky tomu nedochází k syntéze zmíněných aminokyselin a je narušen floémový transport (Prokop, 2009). Nedostatek těchto aminokyselin je kritický pro růst nových tkání a jejich nepřítomnost vede k zániku rostliny (Yu, 2007). Přestože byla u tohoto typu herbicidů nalezena také metabolická rezistence (Prokop, 2009) a mnohočetná rezistence spojující metabolickou rezistenci s rezistencí v místě účinku (Yu, 2007), nejčastějším mechanismem rezistence je jednoduchá bodová mutace v genu ALS (Yu, 2008). Dávka, potřebná k likvidaci rezistentních biotypů potom musí být až 350x vyšší ve srovnání s citlivými biotypy. Při detekci bodových mutací bylo zjištěno nejméně 17 aminokyselinových substitucí v genu ALS, které způsobují rezistenci rostlin, kvasinek, bakterií a zelených řas k herbicidům s funkcí ALS-inhibitorů. Pouze 6 typů substitucí bylo detekováno v plevných rostlinách: Ala¹²², Pro¹⁹⁷, Ala²⁰⁵, Asp³⁷⁶, Trp⁵⁷⁴ a Ser⁶⁵³ (Warwick, 2008). Jednoduchá záměna aminokyseliny na jedné z těchto pozic za jinou aminokyselinu pak způsobí rezistenci celé rostliny.

V České republice jsou nejzávažnější problémy související s rezistencí k inhibitorům ALS zaznamenávány v posledních letech u populací chundelky metlice *Apera spica-venti* L. První záznamy o výskytu rezistentních populací chundelky k herbicidům z této skupiny v České republice jsou z roku 2005. V roce 2009 byla zaznamenána populace s vícenásobnou rezistencí k herbicidům se třemi mechanismy účinku současně (www.weedscience.org). Jedním z důvodů, proč jsou problémy s rezistencí k ALS inhibitorům nejvýznamnější právě u chundelky je velmi rychlá populační dynamika daná krátkou dormancí semen v půdě a vysokou schopností generativního rozmnožování (jedna rostlina je schopna produkovat více než tisíc semen). Populační dynamika chundelky je dále v posledních letech podporována zvyšováním podílu ozimých plodin v pěstebních systémech spolu se zvyšujícím se podílem ploch s omezeným zpracováním půdy nebo přímým setím do nezpracované půdy (Melander et al, 2008). Omezené zpracování půdy a mělké uložení semen v půdě (do 5 mm) vytváří příznivé podmínky pro klíčení chundelky, zvláště v kombinaci s teplým a vlhkým počasím. (Cousens a Moss 1990, Mikulka 2009).

Cílem této práce bylo proto vyhodnocení vlivu aplikace jednotlivých skupin herbicidů, jejich dávky, vzájemných kombinací a použití společně s adjuvanty na selekci rezistentních biotypů chundelky v populaci s přirozeným výskytem mutace na pozici Pro¹⁹⁷.

Metodika

V letech 2007–2008 byly založeny pokusy zaměřené na vyhodnocení vlivu dávky několika skupin herbicidů, jejich kombinací a aplikací s adjuvanty pro selekci rezistentních biotypů chundelky metlice. Na pokusné lokalitě s vysokým výskytem chundelky metlice a prokázanou přítomností rezistentních biotypů k ALS inhibitorům (mutace na pozici Pro¹⁹⁷) byly v porostu ozimé pšenice založeny maloparcelkové pokusy o velikosti parcel 10 m². Pokusy byly založeny ve třech opakováních uspořádaných v randomizovaných blocích. V prvním pokuse byly varianty ošetření tvořeny neošetřenou kontrolou a ošetřením herbicidy z různých skupin účinku. Inhibitory ALS byly zastoupeny účinnou látkou sulfosulfuron (Monitor 75 WDG, plná dávka 26 g.ha⁻¹), inhibitory fotosystému II účinnou látkou isoproturon (Protugan, plná dávka 2 l.ha⁻¹), inhibitory acetyl CoA carboxylasy, pak účinnou látkou fenoxaprop-P-ethyl (Puma Extra, plná dávka 1 l.ha⁻¹), která náleží do starší skupiny aryloxyphenoxy-propionátů (FOP), a dále účinnou látkou pinoxaden (Axial, plná dávka 0,45 l.ha⁻¹), který patří do zcela nové skupiny phenylpyrazolinů (DEN). Všechny

přípravky byly aplikovány celkem ve čtyřech variantách: 100%, 75%, 50% a 25% plné dávky. Ve druhém experimentu byly výše uvedené herbicidy doplněny o účinnou látku iodosulfuron-methyl (Husar) a tyto herbicidy pak testovány samostatně a v kombinaci s inhibitorem ALS (sulfosulfuron). Dále byl v tomto experimentu ověřován vliv kombinace s kapalným hnojivem DAM a vybranými adjuvanty na selekci rezistence.

V průběhu vegetace (po vymetání) byly z každé parcely odebrány vzorky přežívajících rostlin chundelky metlice a následně provedeny PCR analýzy na přítomnost mutace ALS na pozici Pro¹⁹⁷, která byla popsána pro řadu jednoděložných plevelů a je zodpovědná za vznik rezistence k ALS inhibitorům. DNA ze vzorků listů byla izolována Dneasy Plant Mini Kitem firmy Qiagene. Pomocí PCR byla amplifikována část genu ALS, která byla štípána enzymem ECO91I (Fermentas) 16 hodin při 37 °C. Separace PCR produktu po štípání byla provedena na horizontální elektroforéze a vizualizace po obarvení ethidium-bromidem při UV osvětlení. Vzorky s mutací v genu Pro¹⁹⁷ se rozštěpily na dva bendy, zatímco vzorky s jedním bendem obsahují mutaci v jiné aminokyselině či jiný typ získané rezistence.

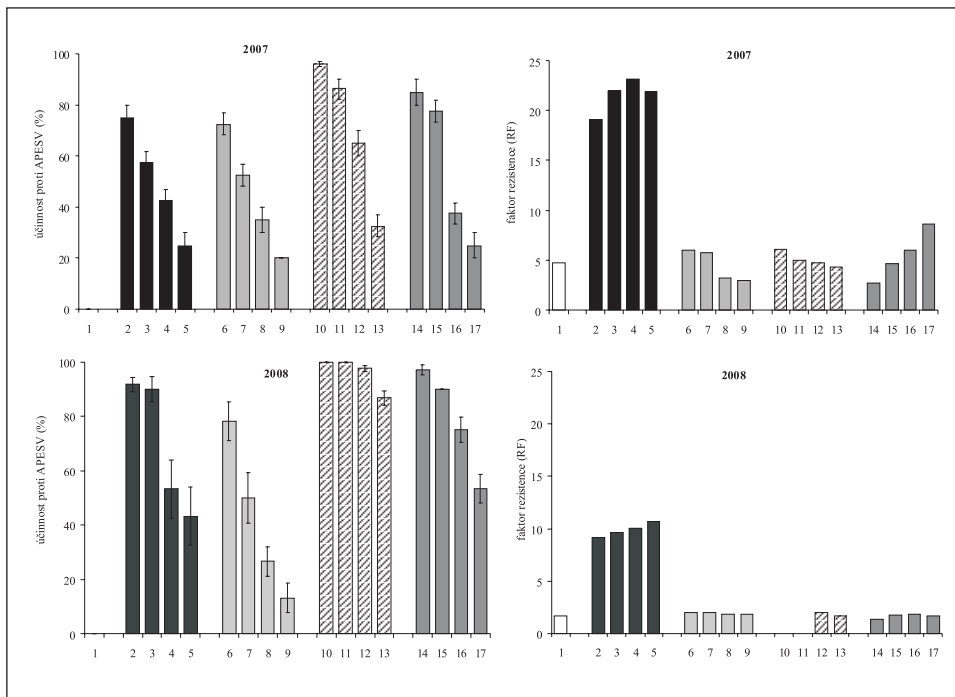
Po vymetání chundelky metlice byla vizuálně vyhodnocena účinnost jednotlivých variant ošetření proti chundelce metlici. V době plné zralosti byly odebrány vzorky lat a vydrolená semena uschována pro biotesty na rezistenci k ALS inhibitorům. Biotesty probíhaly ve skleníkových podmínkách samostatně na vzorcích populace z každého opakování. Rostliny chundelky byly v růstové fázi 2–3 listu ošetřeny logaritmickou koncentrační řadou herbicidu s krokem 3 v dávkách 0N, 0,33N, 1N, 3N, 9N a 27N. N reprezentuje základní dávku herbicidu, která v případě testu na rezistenci k inhibitorům ALS představovala 7,5 g.ha⁻¹ sulfosulfuronu. Přibližně 30 dní po aplikaci bylo provedeno vyhodnocení účinnosti relativně k neošetřené kontrole. Závislost mezi dávkou a reakcí byla fitována pomocí logistické funkce v programu SigmaPlot, přičemž byl vyhodnocen parametr ED₅₀, který reprezentuje dávku, při které je dosaženo 50% účinnosti. Při každém biotestu bylo prováděno také stanovení hodnot ED₅₀ na dvou vysoce citlivých biotypech. Faktor rezistence (RF) byl následně vypočítán jako poměr hodnot ED₅₀ pro testovaný vzorek a citlivý biotyp:

$$RF = ED_{50} \text{ testovaný} / ED_{50} \text{ citlivý.}$$

Faktor rezistence uvádí, koliknásobně je nutné zvýšit dávku herbicidu, aby bylo dosaženo srovnatelné účinnosti.

Výsledky a diskuse

Z vyhodnocení účinnosti odstupňovaných dávek jednotlivých skupin herbicidů proti chundelce metlici je patrné, že redukce dávek u všech herbicidů znamená pokles účinnosti proti chundelce metlici. Na pokles dávky reaguje nejvíce účinná látka isoproturon, naopak nejvyšší jistotu účinku i při nižších dávkách vykazuje v obou letech pinoxaden. Účinnost inhibitoru ALS – sulfosulfuronu je do značné míry závislá na počáteční úrovni rezistence v populaci chundelky. V roce 2007 kdy byl faktor rezistence k inhibitorům ALS u kontrolní varianty prakticky dvojnásobný, ve srovnání s rokem 2008 bylo již u nejvyšší dávky dosaženo přibližně o 20% nižší účinnosti. Vyšší počáteční úroveň rezistence se ovšem projevuje také na selekci biotypů rezistentních k ALS inhibitorům. V obou ročních byl výsledný faktor rezistence v populaci chundelky přibližně 4x vyšší po aplikacích sulfosulfuronu, než u herbicidem neovlivněné populace. V roce 2007 faktor rezistence RF dosahoval hodnot okolo 20 (při počáteční úrovni faktoru rezistence okolo 5), zatímco v roce 2008 činil tento faktor jen okolo 9 (při počáteční úrovni RF okolo 2).

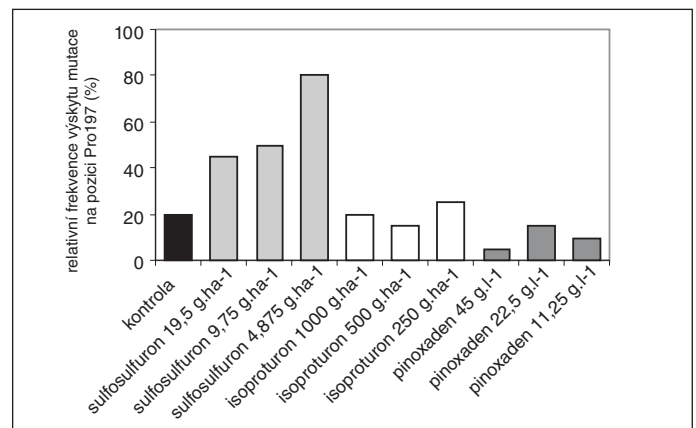


Obr. 1: Účinnost odstupňovaných dávek herbicidů s rozdílným mechanismem účinku proti chundelce metlici a změna faktoru rezistence po jejich aplikaci v populaci chundelky metlice s výskytem rezistentního biotypu s mutací Pro¹⁹⁷

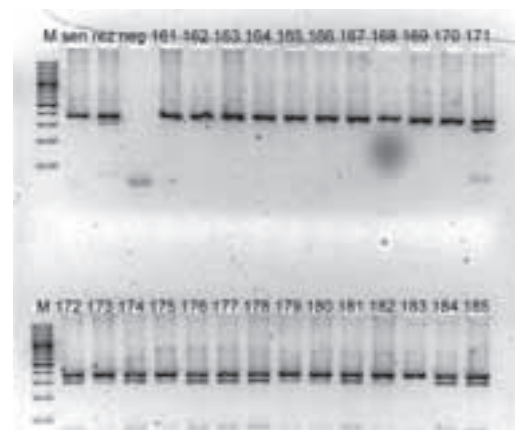
1	kontrola
2	sulfosulfuron 19,5 g.ha ⁻¹
3	sulfosulfuron 14,6 g.ha ⁻¹
4	sulfosulfuron 9,75 g.ha ⁻¹
5	sulfosulfuron 4,88 g.ha ⁻¹
6	isoproturon 1000 g.ha ⁻¹
7	isoproturon 750 g.ha ⁻¹
8	isoproturon 500 g.ha ⁻¹
9	isoproturon 250 g.ha ⁻¹
10	pinoxaden 45 g.ha ⁻¹
11	pinoxaden 33,75 g.ha ⁻¹
12	pinoxaden 22,5 g.ha ⁻¹
13	pinoxaden 11,25 g.ha ⁻¹
14	fenoxaprop-P-ethyl 69 g.ha ⁻¹
15	fenoxaprop-P-ethyl 51,75 g.ha ⁻¹
16	fenoxaprop-P-ethyl 34,5 g.ha ⁻¹
17	fenoxaprop-P-ethyl 17,25 g.ha ⁻¹

Zajímavý je výsledek vazby mezi dávkou herbicidu a výsledným faktorem rezistence. Přestože při poklesu dávky sulfosulfuronu dochází ke zvyšování faktoru rezistence, tento nárůst je velmi malý a zcela neproporcionální k poklesu účinnosti. Z těchto výsledků lze konstatovat, že redukce dávek není primárním hnacím motorem selekce rezistentních populací, ačkoliv k tomuto jevu také zčásti přispívá. Rozhodujícím faktorem pro selekci je tedy opakované používání herbicidních látek se stejným mechanismem účinku. Hlavní motivací pro testování vlivu herbicidů s jiným mechanismem účinku na selekci rezistence k inhibitorům ALS bylo vyloučení křížové rezistence či souběžné selekce k více typům herbicidů. Znalost této skutečnosti je poměrně zásadní pro navržení antirezistentní strategie, jejíž součástí je střídání herbicidů s různým mechanismem účinku, případně používání jejich kombinací. Nárůst rezistence k ALS inhibitorům se ovšem nepotvrdil pro žádnou z testovaných skupin herbicidů. Nižší dávky isoproturonu a pinoxadenu vedly dokonce k velmi malému poklesu faktoru rezistence v populaci. Tyto látky mohou být proto v nižších dávkách potenciálně vhodnými partnery herbicidů ze skupiny ALS inhibitorů pro snížení rizika selekce rezistentních populací chundelky. Účinná látka fenoxaprop-P-ethyl se takto projevuje jen v plné dávce.

Na části variant byly provedeny také molekulární analýzy přítomnosti mutace na pozici Pro¹⁹⁷, která reprezentuje biotypy chundelky rezistentní k ALS inhibitorům. Identifikace rezistentních mutací pomocí elektroforetické separace PCR produktů je patrná z obr. 3. PCR analýzy byly provedeny u variant aplikace tří dávek inhibitoru ALS (sulfosulfuron), inhibitoru PSII (isoproturon) a inhibitoru acetyl CoA carboxylázy (pinoxaden) Výsledky za oba experimentální ročníky jsou shrnuty v obr. 2. Podobně jako v případě biotestů je patrný jednoznačný selekční efekt aplikace ALS inhibitoru – sulfosulfuronu s nárůstem podílu mutace v populaci u nižší dávky. Vliv aplikace isoproturonu na podíl rezistentní mutace v populaci je spíše neutrální. Po aplikaci pinoxadenu byl dokonce zaznamenán pokles podílu této mutace v populaci. Tento pokles je ovšem relativně malý a případný potenciál pinoxadenu pro redukci rezistentních biotypů v populaci by bylo nutné dále ověřit.



Obr. 2: Vliv aplikace herbicidů s rozdílným mechanismem účinku a jejich dávky na relativní frekvenci výskytu mutace na pozici Pro¹⁹⁷ podmiňující rezistenci k ALS inhibitorům (průměrné hodnoty z let 2007 a 2008)



Obr. 3: Fotografie gelů po elektroforetické separaci PCR produktu Pozn.: sen – kontrolní vzorek bez mutace, rez – pozitivní kontrolní vzorek s mutací v Pro¹⁹⁷, neg – negativní kontrola (voda), M – velikostní standard Ladder100bp, 161–170 – kontrolní varianty, 171–185 – vzorky z populace po ošetření ALS inhibitorem (vysoký podíl mutace v Pro¹⁹⁷)



Obr. 4: Náhled na skleníkový test s odstupňovanými dávkami ALS inhibitorů u chundelky metlice

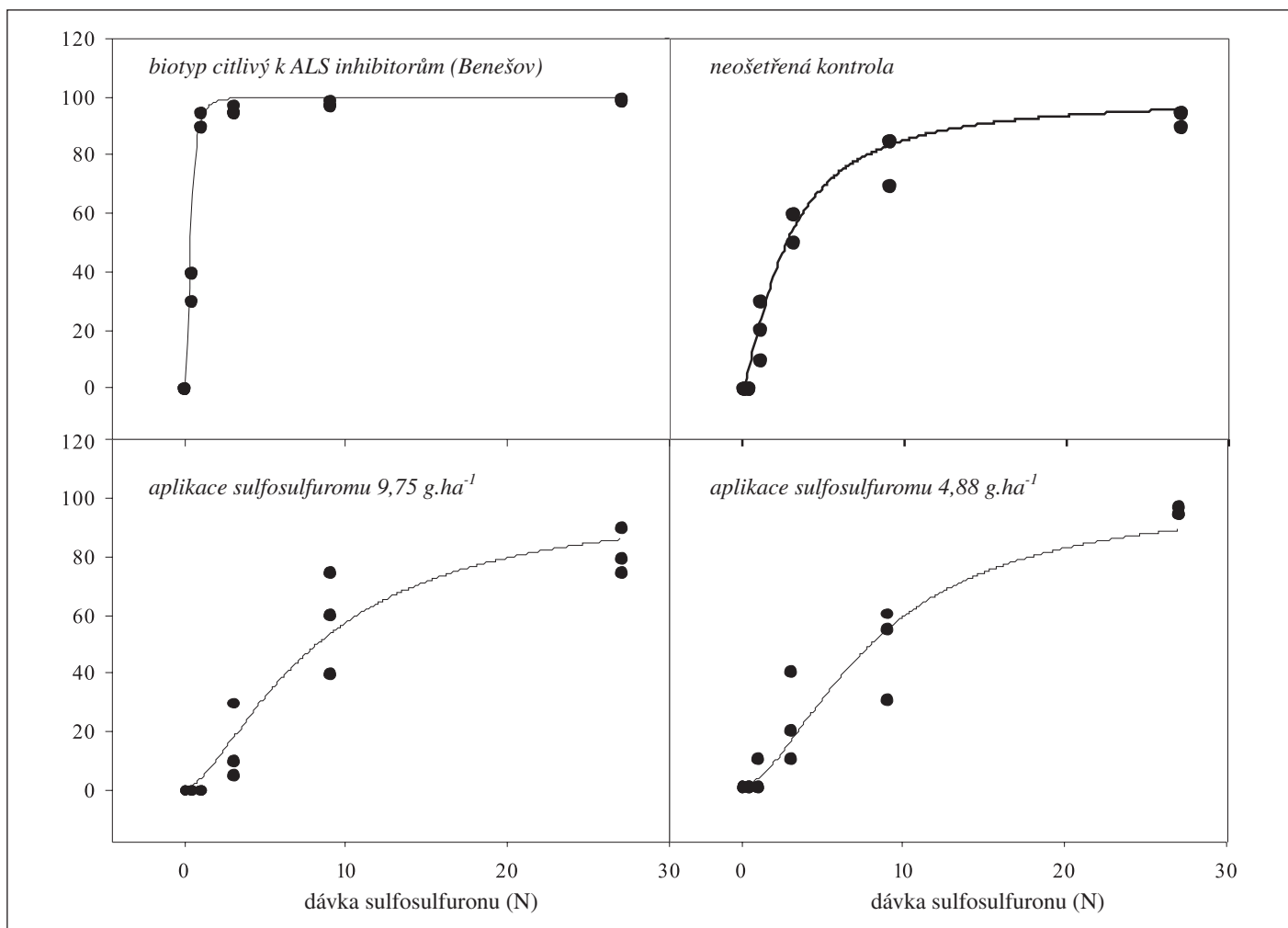
5 A)



5 B)



Obr. 5: Biotest na rezistenci k ALS inhibitorům u biotypu chundelky A) citlivého k ALS inhibitorům B) vzorku populace se zvýšeným podílem rezistentních mutací po aplikaci sulfosulfuronu $9,75 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$ (zleva jsou v obou obrázcích A a B seřazeny testovací dávky sulfosulfuronu 27N, 9N, 3N, 1N, 0,33N a 0N)



Obr. 6: Změna křivek logistické závislosti mezi dávkou a reakcí na ALS inhibitor (sulfosulfuron) u citlivého biotypu chundelky, vzorku populace s přirozeným výskytem mutace Pro_{197} neošetřeného herbicidy a po ošetření dvěma dávkami účinné látky sulfosulfuron

Praktický význam pro plánování antirezistentní strategie má také ověřování vlivu kombinací účinných látek s odlišným mechanismem účinku na selekci rezistentních populací. Ve dvouletých polních experimentech (obr. 7) bylo přitom prokázáno, že použití různých účinných látek ze skupiny ALS inhibitorů (sulfonylmočoviny) má prakticky stejný účinek na selekci rezistence a zvýšení faktoru rezistence bylo prakticky srovnatelné po aplikaci sulfosulfuronu i iodosulfuronu. Přestože kombinace těchto dvou účinných látek vykazovala mírně nižší hodnoty faktoru rezistence, využití kombinací účinných látek se stejným mechanismem účinku nemá pro antirezistentní strategii praktický význam. Naopak jako velmi zajímavé se jeví kombinace inhibitorů ALS s nižšími dávkami herbicidů ze skupiny inhibitorů acetyl CoA carboxylázy (pinoxaden a fenoxaprop-P-ethyl). Obě účinné látky byly schopny prakticky zastavit proces selekce, protože u kombinace sulfosulfuronu s těmito herbicidy nedocházelo ke zvyšování faktoru rezistence. Pouze v menší míře redukuje nárůst faktoru rezistence kombinace s inhibitorem PSII (isoproturon). Pozitivní, ale opět relativně malý, je také efekt kapalného hnojiva DAM 390 a adjuvantů. Snížení selekčního tlaku při použití těchto kombinací má spíše využití jako preventivní opatření, než jako zásah eliminující již rezistentní populace chundelky.

Závěr

- v populaci s výskytem rezistence k ALS inhibitorům (mutace na pozici Pro¹⁹⁷) se vlivem selekce vyvolané aplikací herbicidu ze skupiny ALS inhibitorů zvyšuje faktor rezistence více než čtyřnásobně
- redukce dávek herbicidů zvyšuje selekční tlak (zvyšuje faktor rezistence) ale tento efekt je mnohonásobně nižší než opakované použití herbicidu se stejným mechanismem účinku
- kombinace herbicidu ze skupiny ALS inhibitorů s vhodným herbicidem s odlišným mechanismem účinku (především s inhibitory acetyl CoA carboxylázy) může zcela eliminovat selekční tlak na rezistenci
- kombinace s kapalným hnojivem DAM 390 a adjuvanty

snížují selekční tlak relativně málo a jsou proto využitelné pouze jako preventivní opatření

Poděkování

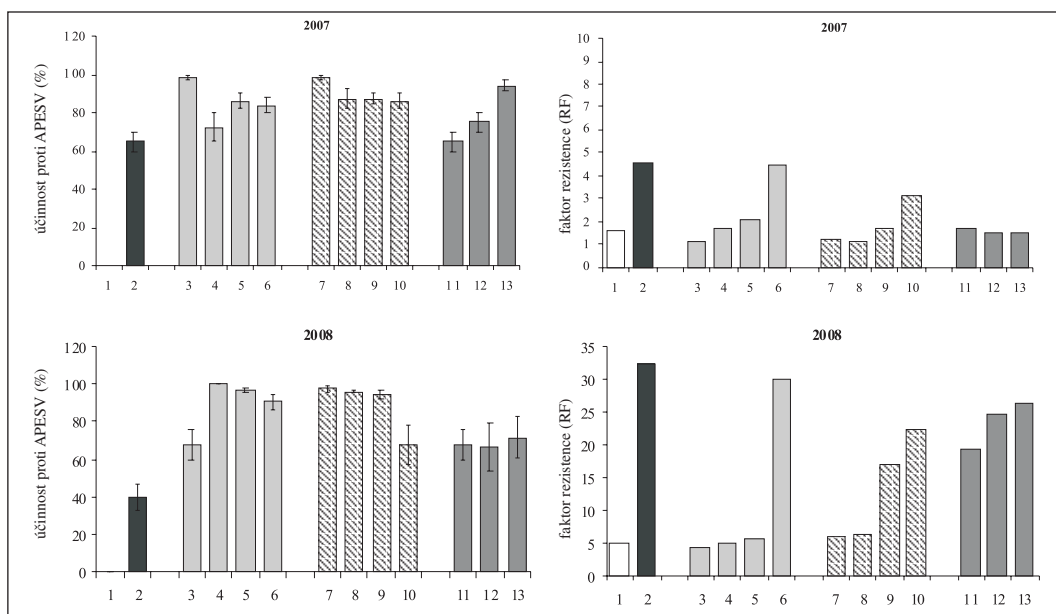
Práce vznikla za podpory projektu MZe – NAZV číslo QH71218.

Literatura

- Cousens, R., and S. R. Moss. 'A Model of the Effects of Cultivation on the Vertical-Distribution of Weed Seeds within the Soil', *Weed Research* Vol. 30, No. 1, 61–70, 1990.
- Melander B., Holst N, Jensen P. K., Hansen E. M., Olesen J. E., Apera spica-venti population dynamics and impact on crop yield as affected by tillage, crop rotation, location and herbicide programmes. *WEED RESEARCH*, 48, Issue 1, 48–57, 2008
- Mikulka, J. (2009): Inovace metod diagnostiky rezistence plevelů a jejich využití z hlediska optimalizace používání herbicidů s cílem minimalizace rizika jejich negativního vlivu na diverzitu rostlin v agroekosystému. Periodická zpráva. Projekt QH71218, Praha, <http://www.mze-vyzkum-infobanka.cz/zpravy-13168.aspx>
- Prokop, M.: Obrana plevelů proti ošetření herbicidy. *Rostlinolékař 4*: 35–38 (2009)
- Warwick S. I., Xu R., Sander C., Beckie H. J.: Acetolactate synthase target-site mutation and single nucleotide polymorphism genotyping in ALS-resistant *Kochia (Kochia scoparia)*. *Weed Science* 56: 797–806 (2008)
- Yu Q., Nelson J. K., Zheng M. Q., Jackson M., Powles S. B.: Molecular characterisation of resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Hordeum leporinum* biotypes. *Pest Manag Sci* 63: 918–927 (2007).
- Yu Q., Han H., Powles S. B.: Mutations of the ALS gene endowing resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* population. *Pest Manag Sci* 64: 1229–1236 (2008).

Recenzováno

Adresa autora: Matusinsky.pavel@vukrom.cz



Obr. 7 Účinnost kombinací inhibitoru ALS (sulfosulfuron) s herbicidy s odlišným mechanismem účinku a adjuvanty proti chundelce metlici a změna faktoru rezistence po jejich aplikaci v populaci s výskytem rezistentního biotypu s mutací na pozici Pro¹⁹⁷

- kontrola
- sulfosulfuron 9,75 g.ha-1
- isoproturon 1000 g.ha-1
- pinoxaden 45 g.ha-1
- fenoxaprop-P-ethyl 69 g.ha-1
- mesomaxx 4,5 g.ha-1 + iodosulfuron-methyl 0,9 g.ha-1

- sulfosulfuron 9,75 g.ha-1 + pinoxaden 30 g.ha-1
- sulfosulfuron 9,75 g.ha-1 + fenoxaprop-P-ethyl 55,2 g.ha-1
- sulfosulfuron 9,75 g.ha-1 + isoproturon 750 g.ha-1
- sulfosulfuron 9,75 g.ha-1 + mesomaxx 3 g.ha-1 + iodosulfuron-methyl 0,6 g.ha-1

- sulfosulfuron 9,75 g.ha-1 + DAM 390 100 l.ha-1
- sulfosulfuron 9,75 g.ha-1 + heptamethyltrisiloxan 84 g.ha-1
- sulfosulfuron 9,75 g.ha-1 + metylester řepkového oleje 730 g.ha-1