

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Anamarija JAGODIČ

**PREUČEVANJE KEMIČNE KOMUNIKACIJE MED
ENTOMOPATOGENIMI OGORČICAMI (Rhabditida:
Steinernematidae in Heterorhabditidae) IN
POŠKODOVANIMI TER NEPOŠKODOVANIMI
GOMOLJI KROMPIRJA (*Solanum tuberosum* L.)**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Anamarija JAGODIČ

**PREUČEVANJE KEMIČNE KOMUNIKACIJE MED
ENTOMOPATOGENIMI OGORČICAMI (Rhabditida: Steinernematidae
in Heterorhabditidae) IN POŠKODOVANIMI TER
NEPOŠKODOVANIMI GOMOLJI KROMPIRJA (*Solanum tuberosum* L.)**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**TESTING CHEMICAL COMMUNICATION BETWEEN
ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES (Rhabditida: Steinernematidae
and Heterorhabditidae) AND DAMAGED/UNDAMAGED POTATO
TUBERS (*Solanum tuberosum* L.)**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje smeri agronomija. Delo je bilo opravljeno na Katedri za fitomedicino, kmetijsko tehniko, poljedelstvo, pašništvo in travništvo.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Žiga LAZNIKA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gregor OSTERC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Žiga LAZNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Dominik VODNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu prek Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Anamarija JAGODIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 632.937.1:631.467:633.491:631.936.2 (043.2)
KG	entomopatogene ogorčice/kemična komunikacija/gomolji krompirja
AV	JAGODIČ, Anamarija
SA	LAZNIK, Žiga (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Magistrski študijski program 2. stopnje Agronomija
LI	2016
IN	PREUČEVANJE KEMIČNE KOMUNIKACIJE MED ENTOMOPATOGENIMI OGORČICAMI (Rhabditida: Steinernematidae in Heterorhabditidae) IN POŠKODOVANIMI TER NEPOŠKODOVANIMI GOMOLJI KROMPIRJA (<i>Solanum tuberosum</i> L.)
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	X, 38 str., 6 pregl., 12 sl., 54 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
Al	<p>Entomopatogene ogorčice (EO) igrajo zelo pomembno vlogo pri posredni obrambi rastlin pred škodljivci. Študije so pokazale, da hlapne organske snovi (HOS), ki jih izločajo korenine poškodovanih rastlin, privabljajo EO. Predpostavljali smo, da je posredni odziv EO na HOS odvisen od različnih dejavnikov (strategije EO za iskanje gostitelja, vrste EO, HOS, koncentracije HOS, interakcij med omenjenimi dejavniki). V naši raziskavi smo preučevali štiri vrste EO (<i>Steinernema feltiae</i>, <i>S. carpocapsae</i>, <i>S. kraussei</i> in <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>). Namen naše raziskave je bil preučiti kemotropizem EO na HOS, ki jih izločajo poškodovani/nepoškodovani gomolji krompirja (<i>Solanum tuberosum</i> L.). Do poškodb gomoljev krompirja je prišlo zaradi hranjenja ogrcev gozdnega majskega hrošča (<i>Melolontha hippocastani</i> Fabricius, 1801). V raziskavo smo vključili 6 HOS, ki jih izločajo poškodovani gomolji krompirja; oktanal, dekanal, undekan, nonanal, 6-metil-5-hepten-2-on in 1,2,4,-trimetilbenzen. V raziskavo smo vključili tudi HOS, ki se je izločala iz nepoškodovanih gomoljev krompirja; 2-etyl-1-heksanol. Rezultati naše raziskave so pokazali, da so EO sposobne razločevati med posameznimi HOS, ki jih izločajo poškodovani ali nepoškodovani gomolji krompirja. Na gibanje EO so imele največji vpliv HOS nonanal, oktanal in dekanal. HOS dekanal je v naši raziskavi pri obeh preučevanih koncentracijah (100 % in 0.03 ppm) delovala kot atraktant za EO <i>H. bacteriophora</i> in <i>S. kraussei</i>. Rezultati naše raziskave so pokazali, da je odziv EO na HOS vrstno pogojena lastnost, ki prevladuje nad strategijo iskanja gostitelja, ki so jo v evoluciji razvile EO.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 632.937.1:631.467:633.491:631.936.2 (043.2)
CX entomopathogenic nematodes/chemical communication/ potato tubers
AU JAGODIČ, Anamarija
AA LAZNIK, Žiga (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy, Master Study Programme in Agronomy
PY 2016
TI TESTING CHEMICAL COMMUNICATION BETWEEN ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) AND DAMAGED/UNDAMAGED POTATO TUBERS (*Solanum tuberosum* L.)
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO X, 38 p., 6 tab., 12 fig., 54 ref.
LA sl
AI sl/en
AB Entomopathogenic nematodes (EPNs) play a very important role in indirect defense of plants against pests. Studies have shown that the volatile compounds (VOCs) which are secreted by the damaged roots of plants attract EPNs. We presumed that the indirect reaction of EPNs depends on various factors (species of EPN, EPNs foraging strategy, VOCs, the concentration of VOCs, the interaction between these factors). In our study, we investigated four EPNs species (*Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae*, *S. kraussei* and *Heterorhabditis bacteriophora*). The aim of our study was to examine chemotrophic interactions between EPNs and VOCs secreted by damaged/undamaged potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). Damage of potato tubers was caused by forest cockchafer (*Melolontha hippocastani* Fabricius, 1801) larvae. The study included 6 VOCs secreted by damaged potato tubers; octanal, decanal, undecane, nonanal, 6-methyl-5-heptene-2-one, and 1,2,4-trimethylbenzene. The study also included a VOC that is excreted from undamaged potato tubers; 2-ethyl-1-hexanol. The results of our study show that EPNs can distinguish between VOCs secreted by damaged or undamaged potato tubers. On the movement of EPNs had the greatest impact VOCs nonanal, decanal and octanal. In our study the VOC decanal acted as an attractant for EPNs *H. bacteriophora* and *S. kraussei* in both studied concentrations (pure and 0.03 ppm). The results of our study have shown that the reaction of EPNs to VOCs is species specific characteristic, which prevails over the foraging strategy.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	IX
1 UVOD	1
1.1 POVOD ZA DELO	1
1.2 CILJI RAZISKAVE	2
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED DOSEDANJIH OBJAV	3
2.1 SPLOŠNO O EO	3
2.1.1 Sistematika in morfologija ogorčic	3
2.1.2 Zgodovina uporabe EO.....	3
2.1.3 Biologija EO.....	4
2.1.4 EO v Sloveniji.....	4
2.1.5 Gibanje EO	5
2.2 OPIS IZBRANIH VRST EO.....	6
2.2.1 <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> Poinar	6
2.2.2 <i>Steinernema feltiae</i> (Filipjev)	6
2.2.3 <i>Steinernema kraussei</i> (Steiner)	6
2.2.4 <i>Steinernema carpocapsae</i> Weiser.....	6
2.3 KORENINSKI IZLOČKI.....	7
2.3.1 Vpliv koreninskih izločkov na trofične interakcije	7
2.3.2 Dejavniki, ki vplivajo na koreninsko izločanje.....	8
2.4 VPLIV HLAPNIH RASTLINSKIH IZLOČKOV NA TALNO BIOTO	11

2.4.1 Opis talnih multitrofičnih interakcij	12
2.5 POMEN HLAPNIH KOMPONENT KORENINSKEGA IZLOČKA ZA RASTLINE.....	13
2.6 LABORATIRIJSKE ANALIZE ZA ZAZNAVANJE HLAPNIH RASTLINSKIH IZLOČKOV.....	13
2.7 UPORABA HLAPNIH RASTLINSKIH IZLOČKOV V KMETIJSTVU	14
2.8 HOS, KI JIH IZLOČAJO GOMOLJI KROMPIRJA.....	14
2.9 KROMPIR (<i>Solanum tuberosum L.</i>).....	16
2.9.1 Morfološke značilnosti	16
2.8.3 Kakšna tla ustrezano krompirju.....	16
2.8.4 Gospodarsko pomembne bolezni krompirja	16
2.8.5 Gospodarsko pomembni škodljivci krompirja	17
3 MATERIALI IN METODE DELA	19
3.1 HOS	19
3.2 EO.....	19
3.3 PREUČEVANJE KEMOTROPIZMA EO	19
3.4 STATISTIČNA ANALIZA	21
4 REZULTATI	23
4.1 ANALIZA GIBANJA EO.....	23
4.2 ANALIZA KEMOTROPIČNEGA INDEKSA.....	27
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	31
5.1 RAZPRAVA	31
5.2 SKLEPI	33
6 POVZETEK.....	34
7 VIRI	35
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: ANOVA za gibanje EO iz notranjega v zunanje območje petrijevke	23
Preglednica 2: ANOVA za vrednosti KI	27
Preglednica 3: Učinek različnih HOS na KI EO pri koncentraciji 0.03 ppm ter po 2 urah izpostavljenosti.	28
Preglednica 4: Učinek različnih HOS na KI EO pri čisti koncentraciji ter po 2 urah izpostavljenosti.	28
Preglednica 5: Učinek različnih HOS na KI EO pri koncentraciji 0.03 ppm po 24 urah izpostavljenosti.	29
Preglednica 6: Učinek različnih HOS na KI EO pri čisti koncentraciji po 24 urah izpostavljenosti.	30

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Dokazana zastopanost EO v Sloveniji (Laznik in Trdan, 2011)	5
Slika 2: Infektivne ličinke vrste <i>S. feltiae</i> (foto: J. Rupnik).....	7
Slika 3: Vpliv hlapnih rastlinskih izločkov na talno bioto (Hiltbold in sod., 2011)	11
Slika 4: Uporabljene HOS v poskusu (foto: J. Rupnik)	15
Slika 5: Poljski majski hrošč (levo) in gozdni majski hrošč (desno) (foto: J. Rupnik)	18
Slika 6: Skica poskusa	20
Slika 7: Petrijevke pred postavitvijo v gojitveno komoro (foto: J. Rupnik)	21
Slika 8: Nastavitev poskusa (foto: J. Rupnik).....	22
Slika 9: Vpliv strategije iskanja gostitelja na gibanje EO.....	24
Slika 10: Vpliv vrste EO na gibanje k preučevanim snovem.....	24
Slika 11: Povprečni odstotek ($\pm SN$) EO v zunanjem območju petrijevke po 24 urah pri čisti koncentraciji preučevane HOS	25
Slika 12: Povprečni odstotek ($\pm SN$) EO v zunanjem območju petrijevke po 24 urah pri koncentraciji 0.03 ppm preučevane HOS.	26

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

- HOS hlapne organske snovi
EO entomopatogene ogorčice
IL infektivne ličinke
KI kemotropični indeks
FFS fitofarmacevtsko sredstvo
ITD in tako dalje
DDT dikloro-difenil-trikloroetan
SIG strategija iskanja gostitelja
ČI čas izpostavljenosti
KHOS koncentracija hlapne organske snovi

1 UVOD

1.1 VZROK ZA RAZISKAVO

Entomopatogene ogorčice (EO) so organizmi, ki se uporabljajo v programih biotičnega varstva rastlin. Uvrščamo jih med parazite žuželk (Laznik in Trdan, 2011). Multitrofični sistem lahko sestavljajo rastlina, žuželka in njen naravni sovražniki. Z razumevanjem odnosov med različnimi trofičnimi nivoji se znanost ukvarja šele malo časa (Takabayashi in Dicke, 1996; Gosset in sod., 2009). Rasmann in sod. (2005) so kot prvi poročali o obstoju kemične komunikacije med EO (vrsta *Heterorhabditis megidis*) in koreninami rastline (koruza). Številne tuje (Rasmann in Turlings, 2008; Ali in sod., 2010; Turlings in sod., 2012) in domače raziskave (Laznik in Trdan, 2013, 2016) so kasneje potrdile obstoj kemične komunikacije med rastlinami, žuželkami in EO.

Tla predstavljajo naravni habitat EO, ki jih sistematicno uvrščamo v družini Steinernematidae in Heterorhabditidae. Njihova uporabna vrednost, predvsem kot način biotičnega varstva rastlin pred gospodarsko pomembnimi žuželčjimi vrstami, je dobro poznana (Laznik in sod., 2010; Laznik in Trdan, 2011). Infektivne ličinke (IL) EO predstavljajo parazitsko stopnjo ogorčice, ki v svojem telesu (črevesnih veziklih) nosi simbiotske bakterije. Ob vstopu IL v telo žuželke se začnejo sproščati simbiotske bakterije, ki s svojimi toksini povzročijo oslabitev imunskega sistema žuželk, ki navadno poginejo v obdobju od 24 do 72 ur po infekciji z EO (Laznik in Trdan, 2011).

V evoluciji so EO razvile različne načine (strategije) iskanja svojih gostiteljev (žuželk) (Lewis, 2002; Campbell in sod., 2003). Poznamo vrste EO, ki svojega gostitelja iščejo aktivno. V tleh se premikajo in sledijo kemičnemu signalu, npr. gradientu koncentracije CO₂, katerega količina je povečana zaradi presnovne aktivnosti gostitelja. Ta način iskanja gostitelja so razvile EO vrst *Heterorhabditis bacteriophora* in *Steinernema kraussei* (Lewis, 2002). Obstajajo tudi vrste (*S. carpocapsae*), ki svojega gostitelja iščejo pasivno. Za omenjeno vrsto je namreč značilno, da se v času »iskanja« gostitelja postavi na rep in z miganjem v svojo bližino privabi žuželko, v katero nato vstopi (Campbell in sod., 2003). Evolucijsko se je pri EO razvil tudi tretji, t.i. vmesni način iskanja gostitelja. Gre za način, ki združuje tako pasivni kot aktivni način iskanja gostitelja, značilen predvsem za vrsto *S. feltiae* (Lewis, 2002).

EO se v tleh gibljejo predvsem tako, da sledijo kemičnemu signalu (kemotropizem). S pomočjo kemotropizma tudi zaznajo svojega gostitelja oz. področje, kjer je večja verjetnost, da se bo gostitelj nahajal (Lewis, 2002). Raziskave so pokazale, da na gibanje EO v tleh vpliva več dejavnikov (CO₂, rastlinski izločki, pH, temperatura, električni potencial, HOS (Burman in Pye, 1980; Grewal in sod., 1993; Rasmann in sod., 2005; Shapiro-Ilan in sod., 2012)).

Rizosfera predstavlja okolje za veliko število organizmov (Wenke in sod., 2010). Raziskave so pokazale, da korenine rastlin izločajo različne organske snovi, ki jih lahko uvrščamo med amino kisline, amide, organske kisline, fenole, sladkorje, polisaharide in proteine višjih molekulskih mas (Wenke in sod., 2010). Dokazano je bilo, da se rastline s HOS branijo pred napadom žuželk, patogenimi glivami, bakterijami (Bais in sod., 2006; Hiltpold in sod., 2011). Hiltpold in sod. (2011) v svoji raziskavi navajajo, da rastlina s svojimi izločki spodbuja koristno simbiozo ter alelopatijo.

Med pomembne talne organizme, ki se hranijo s koreninami različnih rastlinskih vrst uvrščamo tudi ogrce. Ogrci so ličinke hroščev iz družine Scarabaeidae. V Sloveniji se najpogosteje pojavlja vrsta poljski majskega hrošča (*Melolontha melolontha*), ki velja za gospodarsko zelo pomembno žuželčjo vrsto, ki dela škodo tako na kmetijskih kot tudi gozdnih rastlinah (Laznik in Trdan, 2015). Sorodnik poljskega majskega hrošča je tudi gozdni majskega hrošč (*Melolontha hippocastani*), ki pa je v Sloveniji manj razširjen.

1.2 CILJI RAZISKAVE

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, kako HOS, ki jih izločajo poškodovani ali nepoškodovani gomolji krompirja vplivajo na odzivnost EO. V poskusu smo uporabili štiri vrste EO; *Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae*, *S. kraussei* in *Heterorhabditis bacteriophora*. Preučevali smo kemotropični odziv ogorčic na šest sintetičnih HOS (nonanal, dekanal, oktanal, undekan, 6-metil-5-hepten-2-on in 1,2,4-trimetilbenzen), ki jih izločajo poškodovani gomolji krompirja. Poškodbe so povzročili ogrci gozdnega majskega hrošča. V raziskavo smo vključili tudi HOS 2-etyl-1-heksanol, ki jo izločajo nepoškodovani gomolji krompirja (Weissteiner, 2010). Poskus je potekal pri dveh različnih koncentracijah, in sicer pri 100 % koncentraciji, ki sicer ne odraža realnega stanja v rizosferi, ter pri volumski koncentraciji 0,03 ppm, ki je povprečna koncentracija hlapnih snovi 10 cm od koreninskega sistema (Weissteiner in sod., 2012). Odzivnost EO smo opazovali po 2 in 24-ih urah.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Predpostavljali smo, da je odzivnost EO na HOS odvisna od različnih dejavnikov, kot so strategija iskanja gostitelja, vrste EO, vrste in koncentracije HOS in interakcij, ki potečajo med omenjenimi dejavniki.

2 PREGLED DOSEDANJIH OBJAV

2.1 SPLOŠNO O EO

2.1.1 Sistematika in morfologija ogorčic

Ogorčice uvrščamo med najstevilčnejše živali na Zemlji. Živijo v vseh ekosistemih. Številne vrste ogorčic uvrščamo med parazite ljudi in živali (Urek in Hržič, 1998). Poznali so jih že v obdobju Starega Egipta. Arheologi so odkrili Eberejev papirus, kjer so opisani nasveti za odpravljanje težav, ki jih povzročajo »gliste« (ogorčice) (Milevoj, 2007).

Ogorčice so valjasti črvi, ki jih uvrščamo v kraljestvo Animalia (živali) in deblo Nemata. Spadajo v razreda Adenophorea (podrazred Enoplia, Chromadoria) in Secrenentea (podrazredi Rhabditia, Spiruria, Diplogasteria) (Nguyen in Hunt, 2007). Vrstno najstevilčnejše so fitoparazitske ogorčice (paraziti rastlin). Uvrščamo jih v več rodov (*Ditylenchus*, *Anguina*, *Heterodera*, *Globodera*, ...) (Urek in Hržič, 1998). Znane so tudi ogorčice, ki parazitirajo žuželke. Govorimo o entomopatogenih ogorčicah (EO). Beseda je sestavljenka iz grških besed *entomon* (žuželka) in *pathos* (bolezen). Ogorčice, ki parazitirajo žuželke sistematicno uvrščamo v dva rodova; *Steinerinema* in *Heterorhabditis* (Nguyen in Hunt, 2007).

Telo ogorčic je nečlenasto, bilateralno-simetrično. Med posameznimi vrstami ogorčic obstajajo razlike v njihovi morfologiji. Telo ogorčic je lahko limonaste, črvaste ali hruškaste oblike. Običajno je pokrito z ovojnico, ki jo sestavlja kutikula in hipodermis. Telesna ovojnica telo varuje pred zunanjimi dejavniki. Kutikulo lahko nadalje razdelimo na epikutikulo, eksokutikulo, mezokutikulo in endokutikulo. Spredaj se nahaja glava z ustno odprtino, ki je obkrožena s šestimi ustnicami (Nguyen in Hunt, 2007). Na njih so izrastki v obliki papil ali ščetin. Telo se konča z repom, ki je vrstno specifično oblikovan. Ker ogorčice nimajo nog, jim premikanje omogoča jeguljasto zvijanje telesa (Milevoj, 2007).

2.1.2 Zgodovina uporabe EO

Njihov pomen v biotičnem varstvu rastlin pred škodljivimi organizmi so odkrili v ZDA. Leta 1923 sta nematologa Glaser in Fox našla ogorčico, ki je parazitirala hrošča vrste *Popillia japonica* Newman. Istega leta jo je raziskovalec Steiner poimenoval *Aplectana kraussei*. Kasneje je nematolog Travassos preimenoval rod *Aplectana* v *Steinerinema* (Gaugler, 2002). Kmalu po odkritju prve vrste so raziskovalci začeli preučevati načine njihovega namnoževanja. Glaser je razvil način gojenja EO z metodo »*in vitro*«. S tako namnoženimi EO je leta 1939 izvedel prvi poljski poskus v New Jersey-ju za zatiranje vrste *Popillia japonica* (Gaugler in Kaya, 1990).

V času po drugi svetovni vojni se je v kmetijstvu močno razmahnila uporaba sintetičnih fitofarmacevtskih sredstev (FFS). Po odkritju škodljivosti le-teh na okolje (Rachel Carson je v knjigi Nema pomlad izpostavila negativno plat insekticida DDT) (Carson, 1972) so raziskovalci širom sveta začeli iskati alternative v varstvu rastlin. V osemdesetih letih prejšnjega stoletja je tako ponovno zaživila ideja o biotičnem varstvu rastlin in uporabi EO, kot enem izmed načinov varstva rastlin (Koppenhöfer in Kaya, 2002).

EO in njihove simbiotske bakterije znanstveniki preučujejo v več kot 40 državah sveta. Njihova uporaba v kmetijstvu dosega vedno večje razsežnosti. Uporabljajo se tako za zatiranje škodljivih žuželk v sadjarstvu, okrasnem cvetju, rekreacijskih površinah, poljedelstvu in zelenjadarstvu (Grewal in sod., 2005).

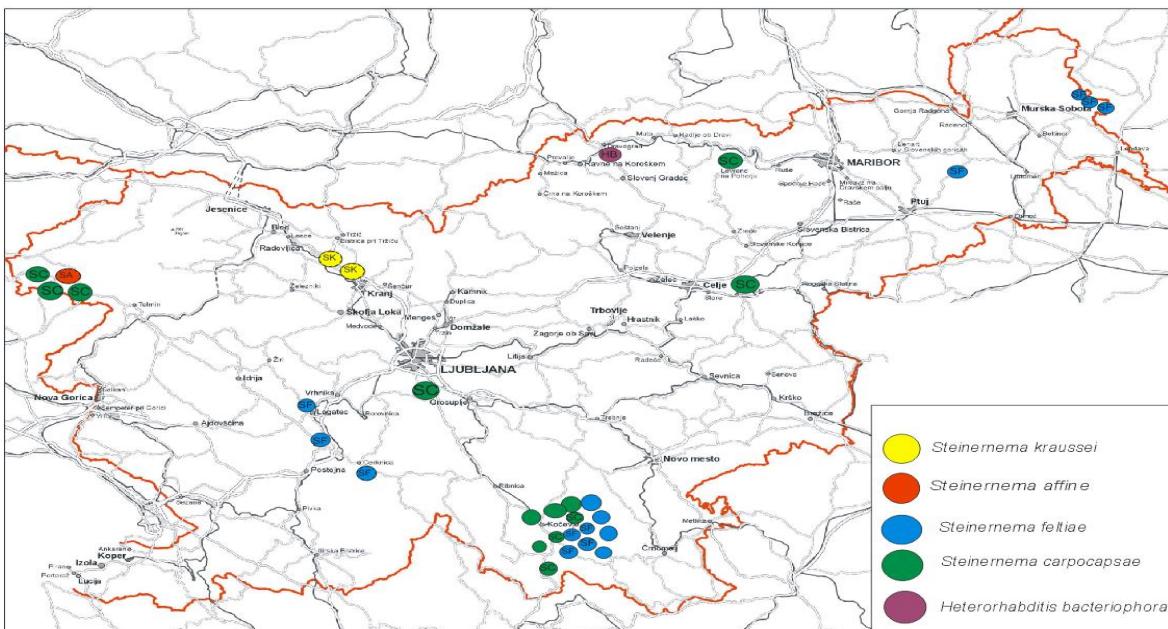
2.1.3 Biologija EO

EO sistematično uvrščamo v družini Steinernematidae in Heterorhabditidae. Za omenjene organizme je značilno, da parazitirajo žuželke. EO živijo v sožitju z bakterijami iz rodu *Photorhabdus* (rod *Heterorhabditis*) in *Xenorhabdus* (rod *Steinernema*). Sposobnost infekcije imajo le t.i. infektivne ličinke (IL), ki predstavljajo 3. larvalno stopnjo EO (Gaugler, 2002). Za IL je značilno, da v svojih črevesnih veziklih nosijo simbiotske bakterije. V omenjeni faziji lahko ogorčica tudi prezivi neugodne okoljske razmere. Ob vstopu EO v žuželče telo (hemolimfni sistem), se prično sproščati bakterije. Te proizvajajo toksine, ki oslabijo imunski sistem žuželk. Gostitelj navadno pogine zaradi odpovedi notranjih organov v obdobju od 24 do 72 ur po infekciji. Odnos, ki so ga ogorčice razvile z bakterijami, je simbiotsko-mutualističen (Gaugler, 2002). Sobivanje obeh organizmov je ključnega pomena, da sistem, ki ga sestavlja ogorčica in bakterija, deluje. EO brez prisotnosti bakterije, ne bi bila sposobna pokončati svojega gostitelja, medtem ko bakterija brez ogorčice ni sposobna vstopiti v gostitelja. Raziskovalci so tudi ugotovili, da bakterija proizvajajo take toksine, ki od razpadajočega se trupla žuželke odganja druge organizme, ki bi se s kadavrom želeti hrani. Bakterije so tudi tiste, ki telo gostitelja razgradijo na take snovi, ki jih lahko ogorčica zaužije (Gaugler, 2002).

2.1.4 EO v Sloveniji

Prve študije na področju preučevanja EO v Sloveniji so se začele leta 2001. Vse do leta 2007 so veljale EO za tujerodne organizme, zaradi česar so bile vse dotedanje raziskave omejene le na laboratorijske poskuse. Tako so slovenski raziskovalci v laboratorijskih poskusih preučili učinkovitost delovanja EO za zatiranje koloradskega hrošča (*Leptinotarsa decemlineata* Say), rastlinjakovega ščitkarja (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood), cvetličnega resarja (*Frankliniella occidentalis* Pergande), riževega žužka (*Sitophilus granaries* L.), bolhačev (*Phylloptreta spp.*), in še nekaterih drugih vrst žuželk (Laznik in Trdan, 2011). Omenjene raziskave so potrdile, da so lahko EO učinkoviti biotični agensi za zatiranje izbranih žuželk, če omejimo omejujoče dejavnike (temperaturni ekstremi, pomanjkanje vlage, UV sevanje, razvojna stopnja žuželke) (Laznik in Trdan, 2011).

Med leti 2006 in 2009 je potekala obsežna študija, kjer so raziskovalci preučevali zastopanost EO v Sloveniji. V sklopu raziskave so preučili 570 talnih vzorcev, ki so bili odvzeti na 114 lokacijah po celotni Sloveniji. Zastopanost EO je bila potrjena v 31 vzorcih (slika 1), kar je predstavljalo le 5 % analiziranih vzorcev (Laznik in Trdan, 2011). V Sloveniji so do danes potrdili zastopanost 5 vrst EO; *S. feltiae*, *S. carposcapsae*, *S. kraussei*, *S. affine* in *H. bacteriophora* (Laznik in Trdan, 2011). Njihova implementacija v programe biotičnega varstva rastlin predstavlja alternativo kemičnim FFS v varstvu rastlin.



Slika 1: Dokazana zastopanost EO v Sloveniji (Laznik in Trdan, 2011)

2.1.5 Gibanje EO

EO išče svojega gostitelja le v razvojni fazi IL. Vanj vstopi preko ustne in zadnjične odprtine, dihal, za vrste iz rodu *Heterorhabditis* pa je dokazano, da lahko v gostitelja vstopijo tudi preko njegove kutikule (Gaugler, 2002). Tekom evolucije so EO razvile različne načine (strategije) iskanja svojih gostiteljev (Lewis, 2002; Campbell in sod., 2003). Poznamo vrste EO, ki svojega gostitelja iščejo z aktivnim premikanjem. Ta način iskanja gostitelja so razvile EO vrst *H. bacteriophora* in *S. kraussei* (Lewis, 2002). Obstajajo tudi vrste (*S. carposcapsae*), ki svojega gostitelja iščejo pasivno. Za omenjeno vrsto je namreč značilno, da se v času »iskanja« gostitelja postavi na rep in z mitetanjem v svojo bližino privabi žuželko, v katero nato vstopi (Campbell in sod., 2003). Evolucijsko se je pri EO razvil tudi tretji, t.i. vmesni način iskanja gostitelja. Gre za način, ki združuje tako pasivni kot aktivni način iskanja gostitelja, značilen predvsem za vrsto *S. feltiae* (Lewis, 2002). Iskanje gostitelja poteka s pomočjo kemotropizma. Gre za zaznavanje kemičnih signalov v okolju. EO sledijo gradientu izločenega CO₂, temperaturi, električnemu polju, spremembu pH, rastlinskim izločkom in HOS (Burman in Pye, 1980; Grewal in sod., 1993; Rasmann in sod., 2005; Shapiro-Ilan in sod., 2012; Laznik in Trdan, 2016).

2.2 OPIS IZBRANIH VRST EO

2.2.1 *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar

Uvrščamo jo med domorodne vrste. Njeno zastopanost so v Sloveniji potrdili na območju Dravograda. Uporablja se za zatiranje poljskega majskega hrošča (*M. melolontha*), jajčastega rilčkarja (*Otiorhynchus sulcatus*), predstavnikov iz reda dvokrilcev (Diptera), metuljev (Lepidoptera) in hroščev (Coleoptera) (Laznik in Trdan, 2011). IL živijo v simbiontsko-mutualističnem odnosu z bakterijo vrste *Photorhabdus luminescens* (Nguyen in Hunt, 2007). Odrasla IL meri med 520 do 600 µm. Idealna temperatura za delovanje vrste je med 20 in 30 °C (Laznik in Trdan, 2011). Svojega gostitelja išče aktivno.

2.2.2 *Steinernema feltiae* (Filipjev)

V Sloveniji smo njeno zastopanost potrdili v 16 vzorcih. Prva najdba je bila potrjena na območju Cerknice (Laznik in Trdan, 2011). Vrsta je komercialno dostopna in se jo uporablja za zatiranje različnih redov (metulji, hrošči, dvokrilci, kožekrilci, resarji, ravnokrilci). Vrsta živi v sožitju z bakterijo *Xenorhabdus bovienii*. Idealna temperatura za delovanje vrste je med 15 in 20 °C. IL doseže velikost med 700 in 1000 µm (Nguyen in Hunt, 2007). Vrsta je razvila vmesni način iskanja gostitelja.

2.2.3 *Steinernema kraussei* (Steiner)

Njeno zastopanost smo v Sloveniji potrdili na območju Gorenjske, blizu vasi Podbrezje (Laznik in Trdan, 2011). Vrsta je komercialno dostopna in se uporablja predvsem za zatiranje hroščev. Živi v simbiontskem odnosu z bakterijo *Xenorhabdus bovienii*. Infektivne ličinke merijo od 700 do 1000 µm. Svojega gostitelja išče aktivno.

2.2.4 *Steinernema carpocapsae* Weiser

Omenjeno vrsto smo v Sloveniji potrdili v 12 odvetih vzorcih. Komercialno dostopna vrsta se uporablja za zatiranje žuželk iz rodov hroščev, metuljev (v metulju vrste *Cydia pomonella* so jo prvič tudi odkrili), resarjev in nekaterih vrst dvokrilcev (Laznik in Trdan, 2011). Živi v simbiontskem odnosu z bakterijo *Xenorhabdus nematophila*. IL so velike med 440 in 650 µm (Nguyen in Hunt, 2007). Optimalna temperatura za njihovo delovanje je med 22 in 28 °C. Svojega gostitelja iščejo pasivno.



Slika 2: Infektivne ličinke vrste *S. feltiae* (foto: J. Rupnik)

2.3 KORENINSKI IZLOČKI

2.3.1 Vpliv koreninskih izločkov na trofične interakcije

Z izrazom rizosfera imenujemo območje v tleh, ki obdaja korenine. Tu je prisotna visoka biološka aktivnost, ki vpliva na številne trofične sisteme (Bais in sod., 2006). Rastline lahko preko rastlinski izločkov izločijo do 20 % fotosintetsko vezanega ogljika (Bais in sod., 2006), s čimer vplivajo na biotične in abiotične dejavnike v tleh. Koreninski izločki lahko v tleh tvorijo kelate, vplivajo na spremembo pH tal, povečajo razgradnjo organskih snovi v tleh s pomočjo povečanega mikrobiološkega metabolizma. Poleg talnih organizmov lahko na izločanje vplivajo tudi abiotski dejavniki. Tako na primer sušni stres vpliva na povečano izločanje ogljikovih molekul (Henry in sod., 2007). Koreninski izločki v sušnih razmerah pripomorejo tudi k zadrževanju vode in s tem omogočajo stabilizacijo talnih delcev v rizosferi (Flores in sod., 1999). Poznamo različne vrste koreninskih izločkov; od amino kislin do kompleksnih polisaharidov, proteinov, manjših hlapnih komponent, ki lahko posredno ali neposredno vplivajo na skupnosti talnih organizmov. Z izločanjem rastlinskih metabolitov se lahko rastline branijo pred koreninskimi škodljivci ter patogeni, imajo pa tudi druge pozitivne učinke kot so uravnavanje mikrobiološke skupnosti, inhibirajo rast sosednjih rastlin, spodbujajo nastanek koristnih simbioz in uravnavajo fizikalno-kemijske lastnosti tal (Flores in sod., 1999).

Rastline so razvile številne načine s katerimi se branijo pred napadom herbivorov. Ločimo jih na neposredne (direktne) in posredne (indirektne). Med neposredne načine lahko uvrščamo morfološke lastnosti (rast dlačic, trnov) in fiziološke (tvorba sekundarnih metabolitov). Dicke in Sabelis (1988) sta kot prva omenila možnost posredne obrambe rastlin pred napadom herbivorov. Gre za princip, kjer rastlina izloča določene hlapljive snovi, ki delujejo kot atraktanti za koristne organizme, ki se hranijo s škodljivimi organizmi. Dosedanje raziskave so pokazale, da koristne organizme lahko privablja tako rastlina kot sam plen (Takabayashi in Dicke, 1996; Bais in sod., 2006). Poleg vizualnih veliko vlogo igrajo tudi kemični signali. Med kemične signale uvrščamo različne sekundarne metabolite rastlin, kot so terpeni, derivati maščobnih kislin, fenil propanoidi in benzoidi. Govorimo o HOS, ki jih proizvajajo tako poškodovane kot tudi nepoškodovane rastline (Mumm in Dicke, 2010). Te snovi delujejo kot atraktanti/repelenti za različne skupine organizmov (žuželke, pršice, polže, ogorčice) (Bais in sod., 2006). Na izločanje HOS vpliva tako vrsta poškodbe (mehanska, herbivorna) kot tudi vrsta herbivora. Gosset in sod. (2009) navajajo, da rastlina, ki jo poškoduje ličinka koloradskega hrošča izloča druge snovi kot tista, ki so jo napadle kolonije listnih uši.

2.3.2 Dejavniki, ki vplivajo na koreninsko izločanje

Do koreninskega izločanja lahko pride pod vplivom biotskih in abiotskih dejavnikov. Tako je koreninsko izločanje odvisno od vrste rastline, temperature, starosti korenin, mikroorganizmov in svetlobe (Bais in sod., 2006).

2.3.2.1 Mineralna prehrana rastlin

Med mineralna hranila spadajo tisti kemijski elementi, ki so za rast rastlin nujno potrebni. Pravimo jim tudi esencialni elementi. Za rastlino je esencialen tisti element brez katerega ne more zaključiti življenskega cikla vse do tvorbe kalivih semen. Za rast in razvoj potrebujejo rastline različne količine mineralnih hranil, tako so elementi, ki sodelujejo v številnih presnovnih procesih zastopani v večjih količinah (Vodnik, 2012).

V tleh se nahajajo mineralna hranila v različnih dostopnih oblikah. Rastlini so neposredno na razpolago hranila, ki se nahajajo v talni raztopini, med tem ko sorpcijsko vezane katione na negativno nabite talne delce, lahko rastline sprostijo v talno raztopino, samo z aktivnostjo korenin in povečanim sproščanjem vodikovih ionov (H^+) v okolico. Mineralna hranila, ki so vezana v organski snovi pa so na razpolago šele potem, ko se organska snov razgradi (Vodnik, 2012).

Odločilno vlogo pri sprejemu mineralnih hranil, še posebej mikroelementov igrajo razmere v rizosferi, kot so; koncentracija mineralnih hranil, pH, redoksi potencial, eksudacija ter mikrobnna aktivnost. Tako se lahko pH rizosfere razlikuje za 2-3 enote od pH tal (Vodnik, 2012).

2.3.2.2 Vrsta rastline

Količina ter spekter koreninskih izločkov se razlikujejo od rastline do rastline. Bais in sod. (2006) navajajo razlike med koreninskimi izločki pšenice in ječmena, ki se kažejo predvsem v vsebnosti sladkorjev kot so galaktoza, glukoza in ramnoza. Specifičnost koreninskih izločkov različnih rastlin vpliva le na določeno skupnost organizmov, kar lahko vidimo na primeru fitoparazitske ogorčice *Heterodera rostochiensis*, ki reagira samo na izločke krompirja, paradižnika in ostalih rastlin iz družine razhudnikov (Solanaceae), medtem, ko izločki pese (*Beta vulgaris* L.) in bele gorjušice (*Brassica* sp.) na njih ne vplivajo (Bais in sod., 2006).

2.3.2.3 Starost korenin

Raziskave, narejene na grahu in ovsu so pokazale, da se največ amino kislin in sladkorjev izloča tekom prvih desetih dni rasti (Bais in sod., 2006). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi raziskovalci, ki so preučevali izločke korenin kumar, paprike in paradižnika (Bais in sod., 2006). Ugotovili so, da se v zgodnji rastni fazи kumare iz njenih korenin izloča snov 3-pirozolilanin, medtem ko se pri papriki in paradižniku izloča snov tirozin, vendar le v času zorenja.

2.3.2.4 Temperatura

Izločanje amino kislin, še posebej asparagina pri paradižniku in podzemni detelji (*Trifolium subterraneum* L.) se povečuje z dvigom temperature. Pri jagodah se asparagin izloča le pri manjših temperaturah (med 5 in 10 °C). Raziskovalci so ugotovili, da ravno zaradi tega največ patogenov jagode napade pri manjših temperaturah (Bais in sod., 2006).

2.3.2.5 Mikroorganizmi

Mikroorganizmi lahko vplivajo na prepustnost koreninskih celic, na metabolizem korenin ter na absorbcijo in izločanje snovi (Hiltbold in sod., 2013). Ugotovljeno je bilo, da lahko nekatere bakterije, glive in celo nekateri antibiotiki (penicillin) vplivajo na povečano izločanje skopoletinina (6-metoksi-7-hidroksikumarin) pri ovsu (Hiltbold in sod., 2013). Ugotovili so tudi, da določeni polipeptidni antibiotiki, kot je polimiksin, ki ga proizvaja bakterija *Bacillus polymyxa*, spremenijo celično prepustnost korenin in s tem povečajo izločanje. Dodatne študije so tudi pokazale, da se je koreninski izloček pšenice ob prisotnosti mikroorganizmov v tleh povečal kar za štirikrat (Hiltbold in sod., 2013). Količina koreninskega izločanja je odvisna tudi od vrste mikroorganizmov, ki kolonizirajo korenine. Na koreninsko izločanje vplivajo tudi fiziološka aktivnost rastlin, kot so; fotosinteza, prepustnost membran, transpiracija, izhlapevanje, zaloge ogljika, pomankanje hranil, citosolna koncentracija, mikoriza in sprostitev mikrobiološega signal (Hiltbold in sod., 2013).

2.3.2.6 Svetloba

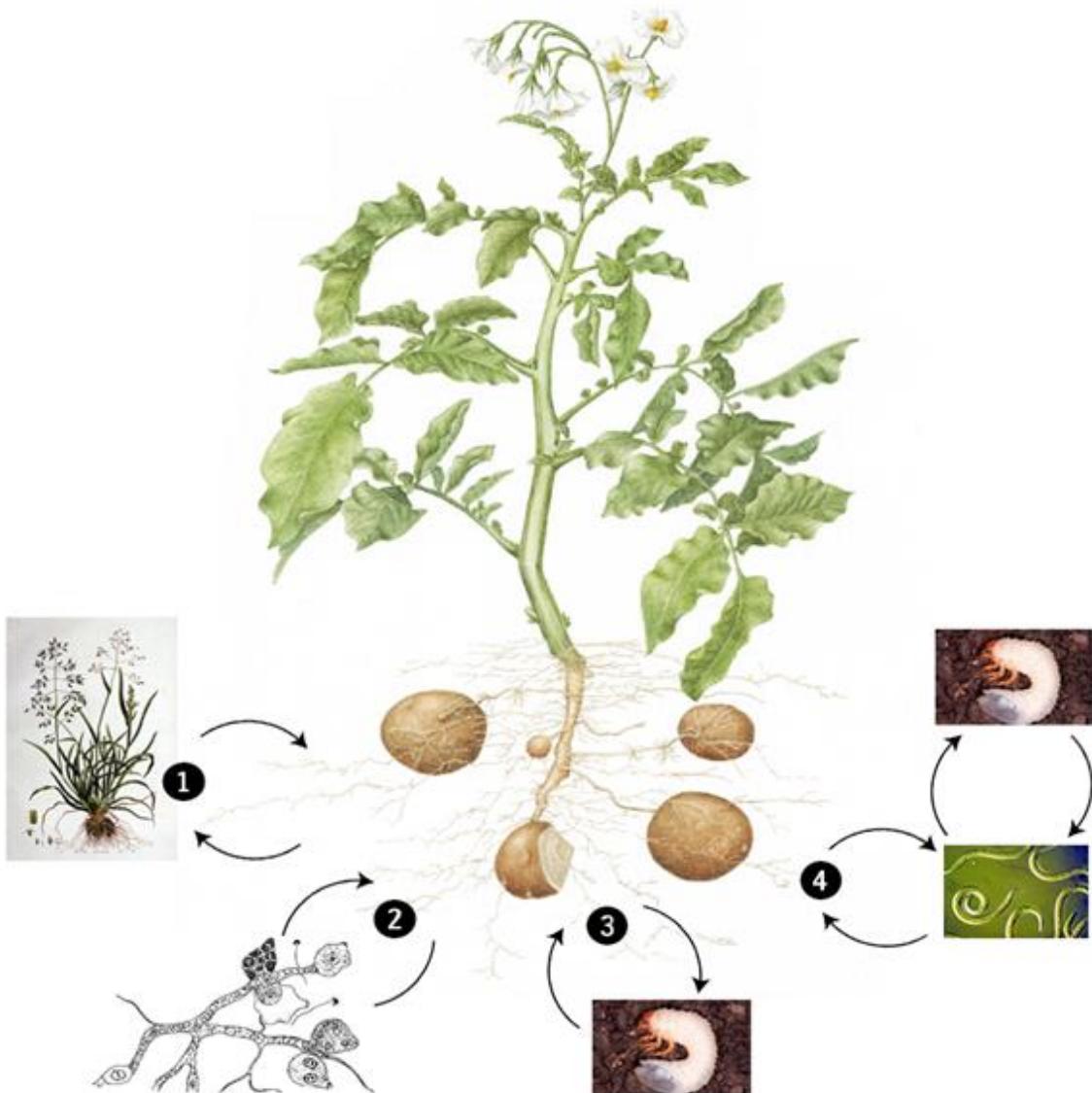
Intenzivnost svetlobe pri kateri rastejo rastline, vpliva na ravnovesje snovi, ki se izločajo v talno raztopino. Podzemna detelja pri polni dnevni svetlobni intenziteti izloči več serina, glutaminske kisline in C-alanina, kot rastline, ki rastejo v 60 % senci (Bais in sod., 2006). V koreninskih izločkih paradižnika nivo glutaminske kisline, levcina, fenilalanina, aspartinske kisline v senčnih legah upada. Poleg teh abiotiskih dejavnikov na koreninsko izločanje vplivajo tudi, vlaga, veter, intenzivnost svetlobe, prostor, atmosferski dušik, ozon, erozija, namakanje, nadmorska višina, lastnosti tal kot so pH, struktura in tekstura tal, dostopnost vode, kationska in anionska izmenjava, organska snov, odvodnjava in globina korenin (Hiltbold in sod., 2013).

2.3.2.7 Talni organizmi

Talni organizmi igrajo pomembno vlogo tako v kmetijstvu, kot v naravnih ekosistemih (Laznik in Trdan, 2015). Reakcija rastlin na napade talnih organizmov je izločanje terpenov in monoterpenov. Do sedaj raziskovalci še niso odkrili ali rastlina izloča tovrstne komponente le ob napadu herbivorov oz. jih ima shranjene v celicah in jih izloči tudi, ko je izpostavljena fiziološkemu stresu (Hiltbold in sod., 2013). Rastline imajo izoblikovano morfološko obrambo, kot so trni, dlačice, encimi, sekundarni metaboliti, katerih prisotnost ni pogojena s prisotnostjo škodljivcev. Poznamo tudi inducirani način obrambe, ki ga delimo na posredni in neposredni način. Neposredni način poteka z izločanjem sekundarnih metabolitov ob napadu škodljivcev, posredni pa poteka z izločanjem HOS, ki privablja naravne sovražnike škodljivcev (Dicke in Sabelis, 1988). Rastline reagirajo na različne tipe poškodbe drugače (mehanske poškodbe, poškodbe herbivorov), zato tudi izločajo različne komponente. Izločanje HOS je pogojeno tudi z vrsto škodljivca (Gosset in sod., 2009). HOS so pogosto opredeljeni, kot atraktanti ali repelenti za podzemne členonožce (Laznik in Trdan, 2013, 2016).

2.4 VPLIV HLAPNIH RASTLINSKIH IZLOČKOV NA TALNO BIOTO

Korenine rastlin izločajo različne vrste snovi v tla, ki omogočajo interakcije med rastlinami in drugimi organizmi (Flores in sod., 1999). HOS naj bi omogočale interakcije na nivoju rastlina-rastlina (slika 3/1), rastlina-mikrobi (slika 3/2), rastlina-škodljivec (slika 3/3) in rastlina-škodljivec-plenilec (slika 3/4).



Slika 3: Vpliv hlapnih rastlinskih izločkov na talno bioto (Hiltbold in sod., 2011)

2.4.1 Opis talnih multitrofičnih interakcij

Številne raziskave so pokazale, da HOS, ki se izločijo v rizosfero kot posledica napada talnih organizmov, povzročijo privabljanje talnih plenilcev (koristnih organizmov). To pomeni, da HOS predstavljajo »SOS klic« (Rasman in sod., 2005; Ali in sod., 2010; Hallem in sod., 2011; Laznik in Trdan, 2013, 2016).

Aratchige in sod. (2004) so ugotovili, da se plenilska pršica *Neoseiulus cucumeris* odzove na HOS, ki jih izločajo čebulice tulipanov napadene s pršico *Aceria tulipae*. Številni avtorji so dokazali, da že zelo majhne količine koreninskih izločkov privabljajo EO k poškodovanim koreninam rastlin (Rasman in sod., 2005; Ali in sod., 2010; Laznik in Trdan, 2013, 2016). Ali in sod. (2010) poročajo, da od rilčkarja *Diaprepes abbreviates* poškodovane korenine citrusov izločajo v rizosfero terpene. Nadalje so ugotovili, da izločene snovi delujejo kot atraktanti za EO *S. diaprepesi*. Ko so korenine citrusov mehansko poškodovali, je bil odziv EO na izločke slabši.

Rasman in Turlings (2008) sta v njuni raziskavi ugotovila, da korenine bombaža (*Gossypium herbaceum*) izločajo več kot 10 različnih komponent, med katerimi so prevladovali terpeni. Med izločenimi HOS naj bi terpenoid aristolen najbolj privabiljal EO *H. megidis*. V omenjeni raziskavi je bil poleg bombaža vključen tudi črni fižol (*Vigna unguiculata*), ki je izločal znatno manjše količine HOS. Kemotropični odziv EO h koreninam črnega fižola je bil v raziskavi znatno manjši kot v primeru bombaža.

Rasman in sod. (2005) so ugotovili, da ličinke koruznega hrošča (*Diabrotica virgifera virgifera*) inducirajo izločanje terpena E-β-kariofilen (E-β-K) iz korenin koruze (*Zea mays*). Njihova raziskava je pokazala, da terpen E-β-K vpliva na EO *H. megidis* privabilno. Omenjena raziskava je kot prva predstavila možnost obstoja multitrofične komunikacije v tleh (rastlina-škodljivec-plenilec). Vrednost njihove raziskave je še toliko večja, saj so pozitivno korelacijo potrdili tako v poskusih v laboratoriju kot na prostem. V sorodni raziskavi slovenskih raziskovalcev (Laznik in Trdan, 2011; Laznik in Trdan, 2013) so le-ti potrdili ugotovitve švicarskih raziskovalcev in dokazali obstoj terpenov linalool ter α-kariofilen, ki sta se izločala iz poškodovanih korenin koruze in delovala kot atraktanta za EO *S. cariocapsae* in *H. bacteriophora*. Slovenski raziskovalci so multitrofično komunikacijo dokazali tudi na primeru navadnega korenja (*Daucus carota* L.), ki je bil predhodno napaden s strunami (družina Elateridae). Ključna ugotovitev v njihovi raziskavi je bila ta, da nepoškodovane korenine korenja izločajo snovi, ki na EO delujejo repellento. To pomeni, da rastlina odda preko kemičnega signala v okolje sporočilo, da je zdrava in ne potrebuje dodatne zaščite (Laznik in Trdan, 2016). Žal še vedno večina HOS, ki so vpletene v talne multitrofične sisteme ostajajo neraziskana, razumevanje teh sistemov pa bi lahko omogočilo optimizacijo postopkov biotičnega varstva rastlin v prihodnje.

2.5 POMEN HLAPNIH KOMPONENT KORENINSKEGA IZLOČKA ZA RASTLINE

Podobno kot ostale lastnosti rastlin, je tudi izločanje podzemnih HOS dedno pogojena lastnost. Raziskav na tem področju ni bilo veliko, zato ni neposrednih dokazov, ki bi kazali na to, da je naravna selekcija vplivala na izločanje HOS za namen obrambe (posredne in neposredne) pred herbivori (Hiltbold in sod., 2013). Nekateri avtorji vseeno navajajo, da je proizvodnja HOS dedna (Ali in sod., 2010; Hiltbold in sod., 2013). Omenjeni avtorji so to dokazali na primeru citrusov in koruze. Pri koruzi tvorjenje E-β-K zmanjša napad škodljivcev in s tem tudi zmanjša količino uničenih korenin (Degenhardt in sod., 2009). Tako tuji kot tudi domači raziskovalci ugotavljajo, da je večina kultivarjev koruze, ki jih poznamo danes, zaradi križanj in drugih žlahtniteljskih postopkov izgubila sposobnost tvorbe tovrstnih signalnih alarmov (Köllner et al. 2008; Laznik in Trdan, 2011). Spet drugi avtorji navajajo, da talni organizmi močno vplivajo na nivo populacijske variabilnosti HOS (Maron in Kauffman, 2006). Tako lahko večji napad talnih organizmov privede do povečanega izločanja bolj toksičnih HOS. Rastlina lahko izloča snovi kot so benzaldehid, timol, limonen, neral, geranal in karvakrol za obrambo pred škodljivci. Te snovi imajo lahko tudi antiseptično in nemacidno vlogo (Rohloff 2002). Obramba rastlin pred škodljivci s pomočjo HOS je lahko energetsko zelo potratna, tako da so rastline primorane skleniti kompromis med obrambo in rastjo (Ali in sod., 2011). Tako na primer hitro rastoča grenka pomaranča (*Citrus aurantium*) privablja EO šele po napadu škodljivcev, medtem ko počasnejše rastoča *Poncirus trifoliata* že med rastjo (ko še ni poškodovana) tvori HOS (Ali in sod., 2011).

2.6 LABORATIRIJSKE ANALIZE ZA ZAZNAVANJE HLAPNIH RASTLINSKIH IZLOČKOV

Številne raziskave o multitrofičnih interakcijah s HOS v tleh, so temeljile le na spremljjanju njihovih učinkov na površju tal. Razlog za to so tehnične težave, ki spremljajo izvedbo eksperimentov v dinamičnem talnem ekosistemu. Tla so več fazni sistem, kar otežuje raziskave posameznih elementov. Večina raziskav je zato potekala »*in vitro*« (Hiltbold in sod., 2013; Rinckow in sod., 2003).

Koreninski izločki so največkrat omenjeni kot tekoči izcedki, ki se izcedijo iz vira. Lahko so tudi hlapni. Rasmann in sod. (2005) so analizirali uporabo HOS kot posredno metodo obrambe koruze spomočjo metode SPME (ang. *solid phase microextraction*). SPME je metoda vzorčenja hlapnih komponent brez uporabe topila. Pri tej metodi se HOS vežejo na kondenzirana silicijeva vlakna od koder jih kasneje sprostimo in analiziramo s plinsko kromatografijo (GC-MS; ang. *Gas chromatography-mass spectrometry*). Za analizo se uporabijo zamrznjene korenine, ki so poškodovane zaradi napada škodljivcev. Te se nato zmelje v prah, ki je kasneje izpostavljen silicijevim vlaknom (Rasmann in sod., 2005). Ta metoda je zelo učinkovita za analiziranje HOS, vendar je destruktivna saj zahteva drobljenje in mletje rastlinskega tkiva.

Obstajajo tudi druge nedestruktivne metode, kot je na primer dinamično vzorčenje s pomočjo adsorpcijskih pasti, pri čemer se hlapne komponente izločijo s pomočjo adsorbenta in topila. Adsorbcijске pasti so steklene cevke, ki vsebujejo adsorbent v obliki granul, ki se nahajajo na nerjaveči mreži s teflonskimi obroči. Adsorbcijске pasti se nato poveže z vakumsko črpalko, ki vleče zrak skozi steklene cevke. Ali in sod. (2010) so na ta način uspeli vzorčiti HOS »*in situ*«. Hlapne komponente, ki se ujamejo v adsorbcijskih pasti se nato izperejo s topilom. Slednja metoda je prav tako zelo učinkovita saj se jo lahko uporabi za ocenjevanje interakcij »*in situ*«.

2.7 UPORABA HLAPNIH RASTLINSKIH IZLOČKOV V KMETIJSTVU

Raziskave so pokazale, da uporaba HOS obeta izboljšave na področju varstva rastlin. Primeri poljskih in laboratorijskih poskusov podpirajo možnost drugačnih ekoloških pristopov pri zatiranju škodljivcev rastlin v kmetijstvu. Tako je na primer Thaler (1999) nanesel jasmonske kislino na rastline paradižnika na poskusnem polju. Poskus je povzročil, da so rastline izločile določeno mešanico HOS, ki bi jo navadno izločile ob napadu škodljivcev iz reda metuljev (Lepidoptera). Pri napadu gošenic so tretirane rastline delovale bolj privabilno za parazitoidno osico *Microplitis rufiventris*, kot rastline, ki so bile samo poškodovane zaradi ličink. Kontrolni poskusi so pokazali, da so bili rezultati takšni zaradi posredovanja rastlin samih in ne samo zaradi kemičnega tretiranja (Rostas in Eggert, 2008). Rezultati dodatnih raziskav, pri katerih so koreninski sistem tretirali s polisaharidom, ki je izloček rjavih alg, so pokazali, da so se HOS izločale hitreje in v večjih količinah kot pri kontrolnih rastlinah, ki so bile izpostavljene samo talnim škodljivcem (Hiltbold in sod., 2013). Ko je inducirana mešanica HOS prepoznana, lahko genetsko vpliva na rastlino tako, da rastlina bolj privablja plenilce in parazitoide ali obnovi fenotip, ki je bil izgubljen tekom naravne ali človeške selekcije in sicer v tej meri, da rastlina zopet privablja možne plenilce in parazitoide (Hiltbold in sod., 2013). Kappers in sod. (2005) so v rastlino *Arabidopsis thaliana* vnesli gen FaNES1 iz jagode za sintezo (3S)-(E)-nerolidola, ki je povzročil, da je rastlina privabila plenilsko pršico *Phytoseiulus persimilis*. Kasneje so rastlino *A. thaliana* transformirali z genom TPS10, ki kodira nastanek terpenov, ki so običajno zastopani v mešanicah HOS pri napadu gošenic (Schnee in sod., 2006). Podobno so tudi Köllner in sod. (2008) v koruzi odkrili gen TPS23, ki je odgovoren za sintezo terpenov (E-β-K). Omenjeni terpen je ključna HOS pri privabljanju nekaterih vrst EO (Rasmann in sod., 2005; Laznik in Trdan, 2013).

2.8 HOS, KI JIH IZLOČAJO GOMOLJI KROMPIRJA

(1) Dekanal: je organska snov s kemijsko formulo C₉H₁₉CHO. Uvrščamo jo med enostavne aldehyde. Dekanal je prisoten v naravi in se uporablja v dišavah in aromah. Nahaja se tudi v citrusih. Izločajo ga poškodovani gomolji krompirja (Weissteiner, 2010).

(2) Oktanal: je organska snov s kemijsko formulo $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CHO}$. Uvrščamo jo med aldehyde. Gre za brezbarvno, tekočo dišavo s sadnim vonjem.

Naravno je prisoten v oljih citrusov. Uporabljajo ga v dišavah in aromah v prehranski industriji. Izločajo ga poškodovani gomolji krompirja (Weissteiner, 2010).

(3) Nonanal: je organska snov, ki jo uvrščamo med alkil-aldehyde. Gre za brezbarvno oljno tekočino. Uporablja se pri izdelavi dišav. Naravno je prisoten v številnih rastlinskih oljih. Za nonanal je bilo dokazano, da privablja komarje (*Culex mosquitoes*). Izločajo ga poškodovani gomolji krompirja (Weissteiner, 2010).

(4) Undekan: znan tudi kot hendekan spada me ogljikovodike s kemijsko formulo $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$. Uporablja se ga za privabljanje različnih vrst metuljev in kot alarmni signal za nekatere vrste mravelj. Sestavljen je iz 159 nizomerov. Uporablja se ga tudi pri plinski kromatografiji. Izločajo ga poškodovani gomolji krompirja (Weissteiner, 2010).

(5) 1,2,4-trimetilbenzen: je organska snov s kemijsko formulo $\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)_3$. Uvrščamo jo med aromatične ogljikovodike. Gre za vnetljivo tekočino z zelo izrazitim vonjem. Netopen v vodi, vendar topen v organskih topilih. Naravno se pojavlja v premogu (Richnow in sod., 2003). Izločajo ga poškodovani gomolji krompirja (Weissteiner, 2010).

(6) 6-metil-5-hepten-2-on je organska snov s kemijsko formulo $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}$. Uporablja se za dišave in arome. Izločajo ga poškodovani gomolji krompirja (Weissteiner, 2010).

(7) 2-etil-1-heksanol spada med kiralne alkohole s kemijsko formulo $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$. Je brezbarven in slabo topen v vodi. Uporablja se v dišavah in aromah, naravno je prisoten v rastlinskih vonjih. Izločajo ga nepoškodovani gomolji krompirja (Weissteiner, 2010).



Slika 4: Uporabljene HOS v poskusu (foto: J. Rupnik)

2.9 KROMPIR (*Solanum tuberosum* L.)

Krompir je enoletna gomoljnica, ki jo uvrščamo v družino razhudnikovk. Od ostalih uporabnih razhudnikovk se razlikuje po tem, da je njegov užitni del gomolj in ne nadzemni del rastline (Kocjan Ačko in Goljat, 2005). Krompir v zmernem in subtropskem pasu uvrščamo med bolj uporabno gomoljnice, prav zaradi njegove hranilne vrednosti. Vsebuje 2 % beljakovin, številne vitamine kot so B₁, B₂, C. Vsebuje tudi veliko kalija, železa, fosforja ter kalcija. Ima veliko škroba in vode, ki jo naj bi vseboval od 65 % do 85 % (Kus, 1994).

2.9.1 Morfološke značilnosti

Korenine pri krompirju se razvijejo iz tako imenovanih živic, ki so očesca na gomoljih in steblu. Korenine so lahko žilaste ali vretenaste, kar pa je odvisno od tega, kako je bil krompir razmnožen. Če je bil vzgojen iz semena potem ima vretenaste korenine, medtem ko ima krompir, razmnožen iz gomolja, žilaste korenine (Kocjan Ačko in Goljat, 2005).

Gomolj krompirja je sestavljen iz skorje, kambija, stržena in prevodnih snopičev. Skorjo razdelimo na periderm in parenhim. Gomolji tehtajo od 50 do 100 g. Na gomoljih se nahajajo očesca, ki jih je največ na zgornjem delu. Ob ugodnih razmerah se iz njih razvijejo kalčki. Namen kožice, ki obdaja gomolj, je varovanje pred okužbami in izsušitvijo (Kocjan Ačko in Goljat, 2005).

Steblo je dvovrstno, trikotne oblike in dlakavo. Gomolji so odebeleni, distalni deli podzemnih stebel. Nadzemna steba oblikujejo grm z višino med 40 in 80 cm, ki se imenuje krompirjevka ali cima. Krompirjevi listi so lihopernati in sestavljeni iz od 3 do 7 lističev. Cvet je samoprašen in predstavlja grozdasto socvetje. Krompirjev plod je dvopredelasta in zaprta večsemenska jagoda, ki nastane s samooploditvijo in vsebuje zelo veliko solanina (Kocjan Ačko in Goljat, 2005).

2.8.3 Kakšna tla ustrezajo krompirju

Najustreznejša tla za gojenje krompirja so ilovnato-peščena tla, globoka do srednje težka s grudičasto strukturo. Primerna temperatura tal za sajenje je okoli 8 °C. Krompirju mora ustrezati tudi pH, ki naj bi se gibal med 5,5 in 6,5. Potrebe krompirja po hranilih za povprečen pridelek 45 t gomoljev/ha so od 140 do 300 kg N/ha, od 50 do 60 kg P₂O₅/ha ter okoli 200 kg K₂O/ha (Kocjan Ačko in Goljat, 2005).

2.8.4 Gospodarsko pomembne bolezni krompirja

Med gospodarsko najpomembnejše bolezni krompirja uvrščamo krompirjevo plesen (*Phytophthora infestans*) in črno listno pegavost (*Alternaria solani*). Krompirjeva plesen (*Phytophthora infestans*) je glivična bolezen, ki lahko v letih, ko so razmere za njen razvoj ugodne, povzroči veliko gospodarsko škodo na krompirjevih nasadih.

Na zgornji strani lističev se pojavijo rumenorjave pege brez izrazitih obrisov. Ukripi za zatiranje so sajenje zdravih gomoljev, gnojenje s hlevskim gnojem naj se izvede že jeseni, pester kolobar, kalijeva gnojila in škropljenje s fungicidi (Kocjan Ačko in Goljat, 2005). Črna listna pegavost (*Alternaria solani*) je bolezen, ki je najnevarnejša v sušnih obdobjih. Širiti se začne v obdobju toplega vremena s kratkotrajnimi nalivi in obilnimi rosami ter pri zračni vlažnosti nad 80 %. Prve okužbe se pojavijo med cvetenjem. Bolezen se pojavi na steblih, gomoljih v obliki okroglih zamaškov, na listih, kjer se pojavijo okrogle velike pege z vzporednimi krogi, ki najprej nastanejo na spodnjem delu lista. Gliva se ohranja na okuženih rastlinskih delih in v tleh v obliki micelija (Kocjan Ačko in Goljat, 2005).

2.8.5 Gospodarsko pomembni škodljivci krompirja

Med gospodarsko pomembnejše škodljivce krompirja uvrščamo koloradskega hrošča (*Leptinotarsa decemlineata*), listne uši (Aphididae), strune (Elateridae), ogrce in rumeno krompirjevo cistotvorno ogorčico (*Globodera rostochiensis*). Kemično zatiramo škodljivce s FFS. Biotično varstvo temelji na uporabi koristnih organizmov (EO) (Laznik in sod., 2010). Ob manjšem napadu je možno nekatere škodljive organizme nadzorovati tudi z ročnim obiranjem in primernim kolobarjem (Kocjan Ačko in Goljat, 2005).

2.8.5.1 Gozdni majska hrošč (*Melolontha hippocastani* Fabricius, 1801)

Uvrščamo ga v red hroščev (Coleoptera) in v družino pahljačnikov (Scarabaeidae). Gozdni majska hrošč velja za gospodarsko manj škodljivega kot njegov sorodnik poljski majska hrošč (*Melolontha melolontha*). Od poljskega majskega hrošča se razlikuje predvsem po velikosti (je manjši, in sicer meri od 22 do 26 mm). Razlikuje se tudi po barvi oprsja (slika 5), ki je rjave barve (Laznik in Trdan, 2013). V Sloveniji je najbolj zastopan na Tolminskem in v Prekmurju.

Gozdni majska hrošč je holometabolna žuželka, saj v njegovem razvoju poznamo vse štiri razvojne stopnje (jajče, ličinka, buba in imago). Odrasli hrošči se pojavijo vsako tretje leto. Hranijo se z listi sadnih in gozdnih drevesnih vrst. Meseca maja samica izlega jajčeca v tla iz katerih se ob koncu avgusta začnejo izlegati ličinke prve razvojne stopnje (L1), ki se ob koncu septembra levijo (L2) in takšne prezimijo. Ličinke imenujemo ogrci in celotni razvoj preživijo v tleh, kjer se hranijo s podzemnimi deli različnih rastlinskih vrst. V drugi polovici julija naslednjega leta se ličinke še zadnjič levijo (L3) in zopet prezimijo. V tretjem letu se ogrci med aprilom in majem preobrazijo v bubo in kasneje v odrasle osebke, ki maja začnejo izletavati (Laznik in Trdan, 2013). Odrasle osebke ločimo od poljskega majskega hrošča tudi po obliki zadka (pigidija), ki je pri gozdnem majskemu hrošču oblikovan v okroglico (slika 6). Ogrci gozdnega majskega hrošča so velikosti; L1 (od 2.1 do 3.0 mm), L2 (od 3.7 do 4.8 mm) ter L3 (od 5.7 do 7.1 mm) (Laznik in Trdan, 2013).



Slika 5: Poljski majski hrošč (levo) in gozdni majski hrošč (desno) (foto: J. Rupnik)

3 MATERIALI IN METODE DELA

Poskus smo opravili v Laboratoriju za fitomedicino, Katedre za fitomedicino, kmetijsko tehniko, poljedelstvo, pašništvo in travništvo na Oddelku za agronomijo, Biotehniške fakultete na Univerzi v Ljubljani, leta 2014.

3.1 HOS

Izbira HOS, ki smo jih uporabili v naši raziskavi, je temeljila na rezultatih tuje raziskave (Weissteiner, 2010). Nemški raziskovalci iz Univerze Georg-August v Göttingenu so preučevali vpliv hranjenja gozdnega majskega hrošča na kemični odziv gomoljev krompirja. Z metodo GC-MS so potrdili, da poškodovani gomolji krompirja izločajo 6 HOS; dekanal, undekan, oktanal, nonanal, 1,2,4-trimetilbenzen in 6-metil-5-hepten-2-on. Analiza je pokazala, da nepoškodovani gomolji krompirja izločajo HOS 2-etyl-1-heksanol. Nakup sintetičnih snovi je bil opravljen pri podjetju Sigma Aldrich (glej sliko 4). Za namen našega poskusa smo uporabili dve koncentraciji sintetičnih snovi. Prvo je predstavljala čista koncentracija. Ker omenjena koncentracija ne odraža stanja v naravi, smo v poskus vključili tudi koncentracijo 0.03 ppm. Gre za koncentracijo HOS, ki je v povprečju zastopana 10 cm od koreninskega sistema krompirja (Weissteiner in sod., 2012).

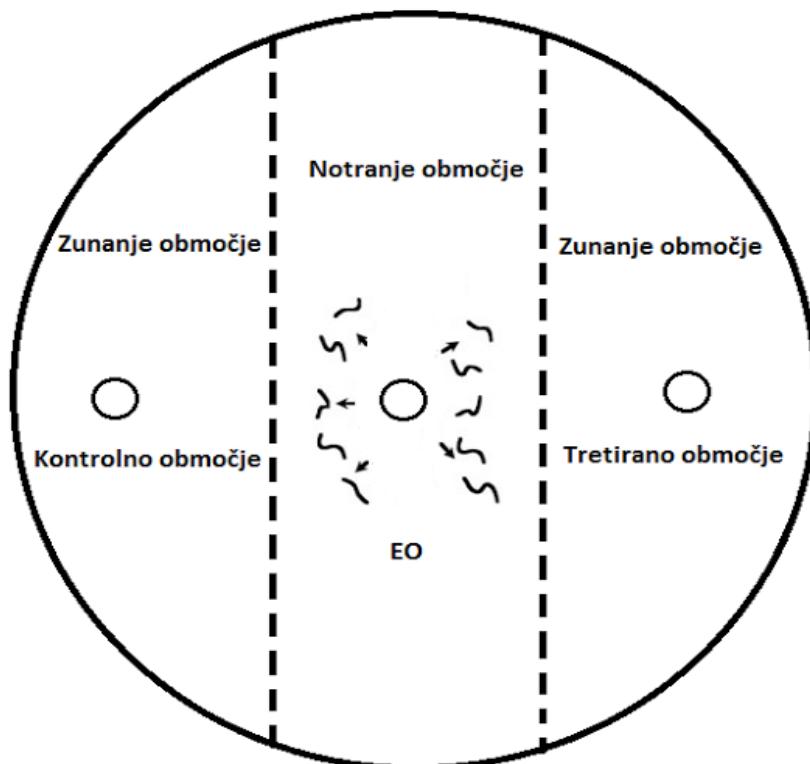
3.2 EO

Vse preučevane EO v poskusu so bile vzgojene z metodo *in vivo* (Laznik in Trdan, 2011). V poskus smo vključili štiri različne vrste EO. Komercialni pripravki Nemasys (a.s. *S. feltiae*), Nemasys C (a.s. *S. carpocapsae*), Nemasys L (a.s. *S. kraussei*) in Nemasys G (a.s. *H. bacteriophora*) so bile naročene pri podjetju BASF (uvoznik za Slovenijo je podjetje Metrob d.o.o.). Uporabljene so bile le IL mlajše od dveh tednov. Shranjene so bile pri 4 °C in gostoti 2500 IL ml⁻¹ (Laznik in Trdan, 2016).

3.3 PREUČEVANJE KEMOTROPIZMA EO

Preučevanje kemotropizma je temeljilo na metodologiji, ki so jo razvili O'Halloran in Burnell (2003), ter modificirali Laznik in Trdan (2013). Laboratorijski poskus je potekal v plastičnih petrijevkah (d= 9 cm; Labortechnika Golias d.o.o., Ljubljana), kamor smo vili 25 ml tehničnega agarja, ki je vseboval 5 mM kalijevega fosfata, 1 mM CaCl₂ ter 1 mM MgSO₄. Petrijevko smo predhodno razdelili na tri dele, znotraj katerih smo označili središče (glej sliko 6). V središče petrijevke (notranje območje) smo s pipeto nanesli kapljico (50 µl), ki je vsebovala približno 100 IL. Na desno stran petrijevke (tretirano območje) smo s pipeto nanesli kapljico (10 µl) izbrane HOS, medtem ko smo na levo stran v enakem volumnu dali kapljico destilirane vode (kontrolno območje). Vsako obravnavanje (preučevana HOS, v določeni koncentraciji z izbrano vrsto EO) je bilo ponovljeno 5 krat. Kontrolno obravnavanje so predstavljale petrijevke, ki so tako na kontrolnem kot tudi tretiranem območju vsebovale kapljico destilirane vode. Petrijevke smo postavili v gojitveno komoro (RK-900 CH, Kambič laboratorijska oprema, Semič).

Poskus je potekal v temi pri temperaturi 22 °C in 75 % relativni zračni vlagi. Gibanje EO smo preverjali po 2h in 24h. Za štetje EO na posameznih območjih v petrijevki smo uporabili binokularni mikroskop (Nikon C-PS) pri 25X povečavi.



Slika 6: Skica poskusa

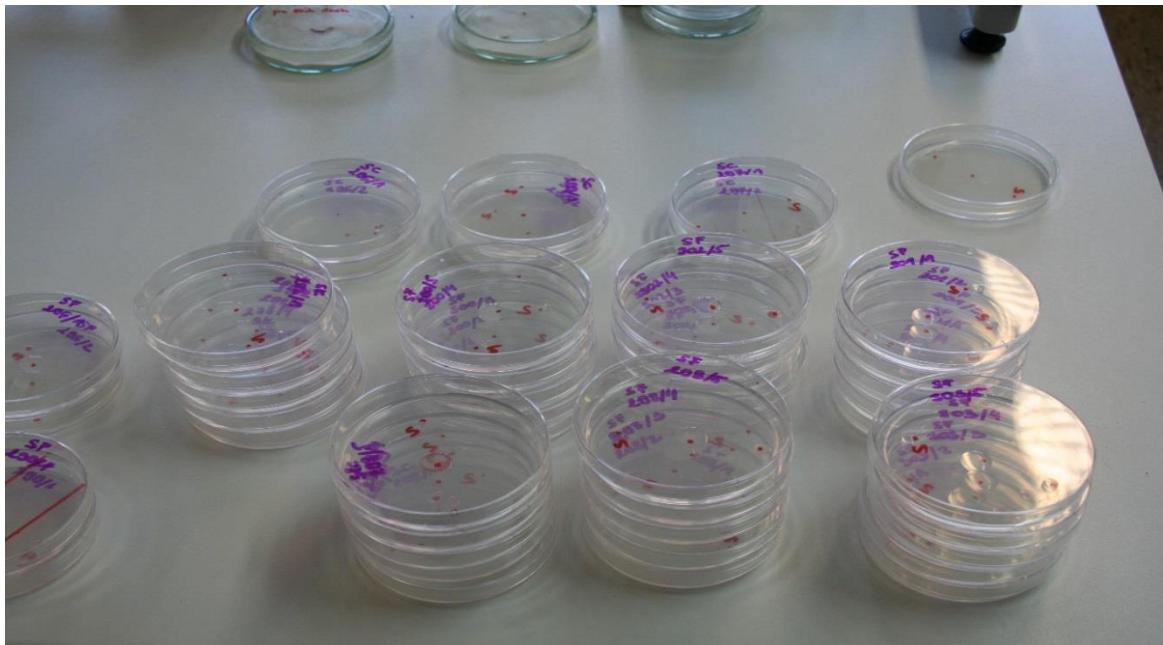
Izračunali smo tudi t.i. kemotropični indeks (KI) (Bargmann in Horvitz, 1991). Indeks je bil izračunan po formuli:

$$KI = (\% \text{ EO v tretiranem območju} - \% \text{ EO v kontrolnem območju}) / 100 \% \quad \dots (1)$$

Vrednosti KI se lahko gibljejo med +1 (snov je popolni atraktant) in -1 (snov je popolni repellent). Laznik in Trdan (2013) sta določila intervale KI; ≥ 0.2 snov je atraktant, med 0.2 in 0.1 je snov šibek atraktant, med 0.1 in -0.1 snov nima vpliva, med -0.1 in -0.2 je snov šibek repellent in ≤ -0.2 je snov repellent za EO.

3.4 STATISTIČNA ANALIZA

Za vsa tretiranja vključno s kontrolo smo določili t.i. preferenčno gibanje EO iz notranjega v zunanje območje petrijevke. Za analizo je bil uporabljen dvojni t-test, kjer se je primerjalo odstotek EO v notranjem in v zunanjem delu petrijevke ($\alpha = 0,05$) (Shapiro-Ilan in sod., 2012). Analiza primerjave odziva EO glede na različne faktorje (vrsta EO, način iskanja gostitelja, vrsta HOS, koncentracija HOS) je bil izračunan povprečni odstotek EO, ki so bile v notranjem oz. zunanjem delu petrijevke. Vrednosti smo primerjali z uporabo analize variance (ANOVA; $\alpha = 0,05$). Analiza variance je bila uporabljena tudi za primerjavo vrednosti kemotropičnega indeksa EO na HOS v različnih koncentracijah in v različnih časovnih intervalih. Statistično značilne razlike smo določili z uporabo Duncanovega testa ($p < 0,05$). Vrednosti smo prikazali kot povrečje \pm standardna napaka (SN). Celotna statistična analiza je bila narejena s pomočjo programa Statgraphics Plus for Windows 4.0. Grafi so bili izdelani s programom MS Office Excel 2010.



Slika 7: Petrijevke pred postavitvijo v gojitveno komoro (foto: J. Rupnik)



Slika 8: Nastavitev poskusa (foto: J. Rupnik)

4 REZULTATI

4.1 ANALIZA GIBANJA EO

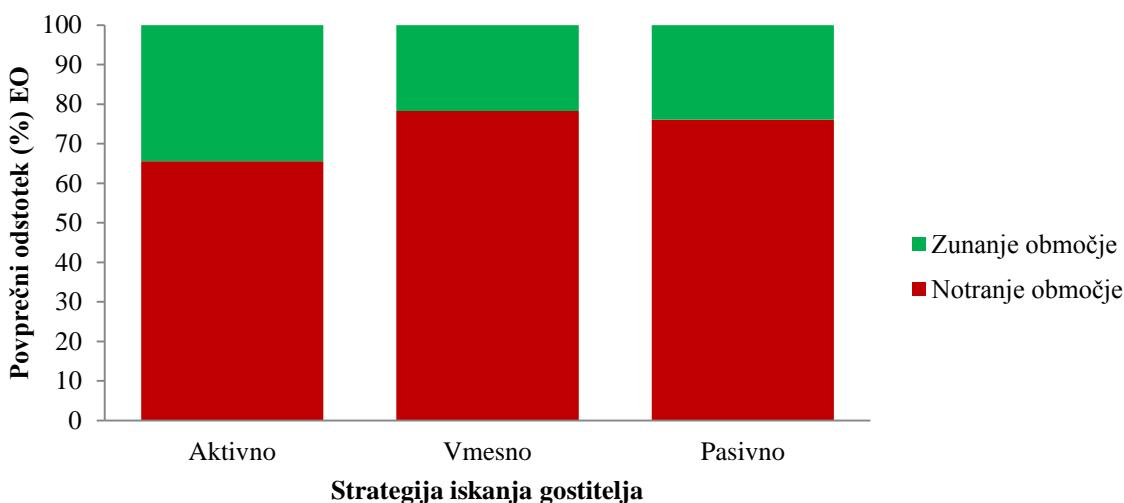
Rezultati statistične analize so pokazali, da je na gibanje EO vplivalo več faktorjev in njihove medsebojne interakcije (preglednica 1).

Preglednica 1: ANOVA za gibanje EO iz notranjega v zunanje območje petrijevke

Faktor	F	df	P
Strategija iskanja gostitelja (SIG)	11.71	2	<0.0001 ^a
Vrsta EO	10.76	3	<0.0001 ^a
HOS	4.86	7	<0.0001 ^a
Čas izpostavljenosti (ČI)	895.56	1	<0.0001 ^a
Koncentracija HOS (k HOS)	12.46	1	0.0004 ^a
Ponovitev	0.85	4	0.8724
SIG × HOS	3.02	14	0.0002 ^a
SIG × ČI	6.99	2	0.0010 ^a
SIG × k HOS	3.34	2	0.0361 ^a
HOS × ČI	1.81	7	0.0820
HOS × k HOS	1.47	7	0.1751
HOS × vrsta EO	4.16	21	<0.0001 ^a
vrsta EO × ČI	16.83	3	<0.0001 ^a
vrsta EO × k HOS	2.4	3	0.0673
SIG × HOS × k HOS	1.55	14	0.0902
SIG × HOS × ČI	5.03	14	<0.0001 ^a
Vrsta EO × HOS × k HOS	0.62	21	0.9066
Vrsta EO × HOS × ČI	6.35	21	<0.0001 ^a

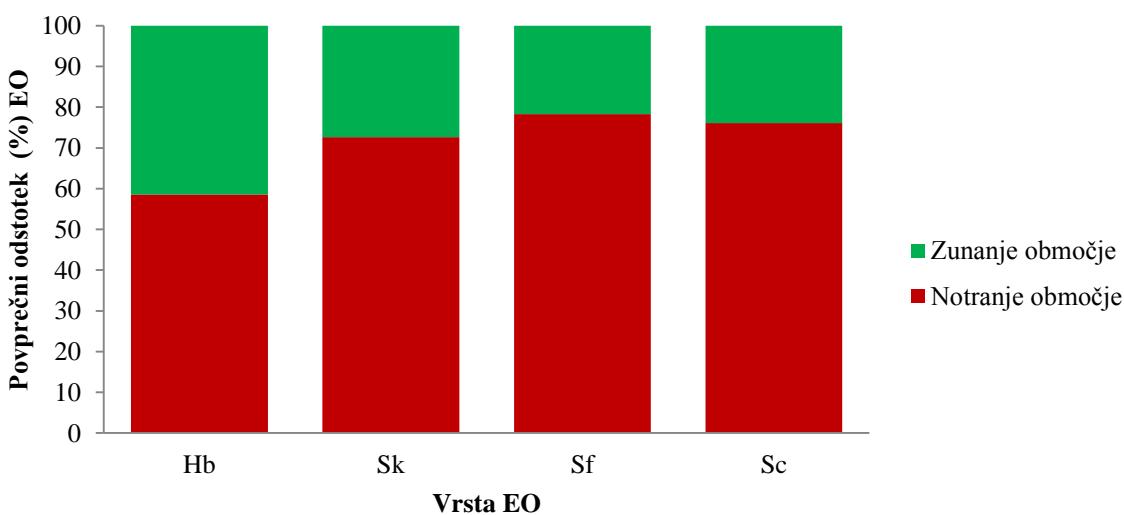
^aStatistično značilne razlike pri $\alpha = 0.05$.

Rezultati t-testa so pokazali statistično značilne razlike med povprečnim odstotkom EO v notranjem ($67.8 \pm 0.9\%$) in zunanjem območju ($32.8 \pm 0.3\%$) po 24 urah. Rezultati dobljeni po 2 urah so pokazali, da se je samo $2.5 \pm 0.4\%$ EO premaknilo iz notranjega proti zunanjemu območju. Gibanje EO je bilo pogojeno tudi s koncentracijo HOS. Pri čisti koncentraciji se je premaknilo $19.9 \pm 1.1\%$ EO, medtem ko je bilo njihovo gibanje pri manjši koncentraciji manjše ($15.7 \pm 1.0\%$). Po 24 urah smo ugotovili statistično značilne razlike v gibanju EO med različnimi strategijami iskanja gostiteljev (slika 9). Več kot tretjina EO (34 %) z aktivnim načinom iskanja gostitelja je bila zastopana po 24 urah v zunanjem območju, medtem ko je bilo gibanje pri vrstah s pasivno (24 %) in vmesno strategijo (22 %) statistično značilno manjše (slika 9).

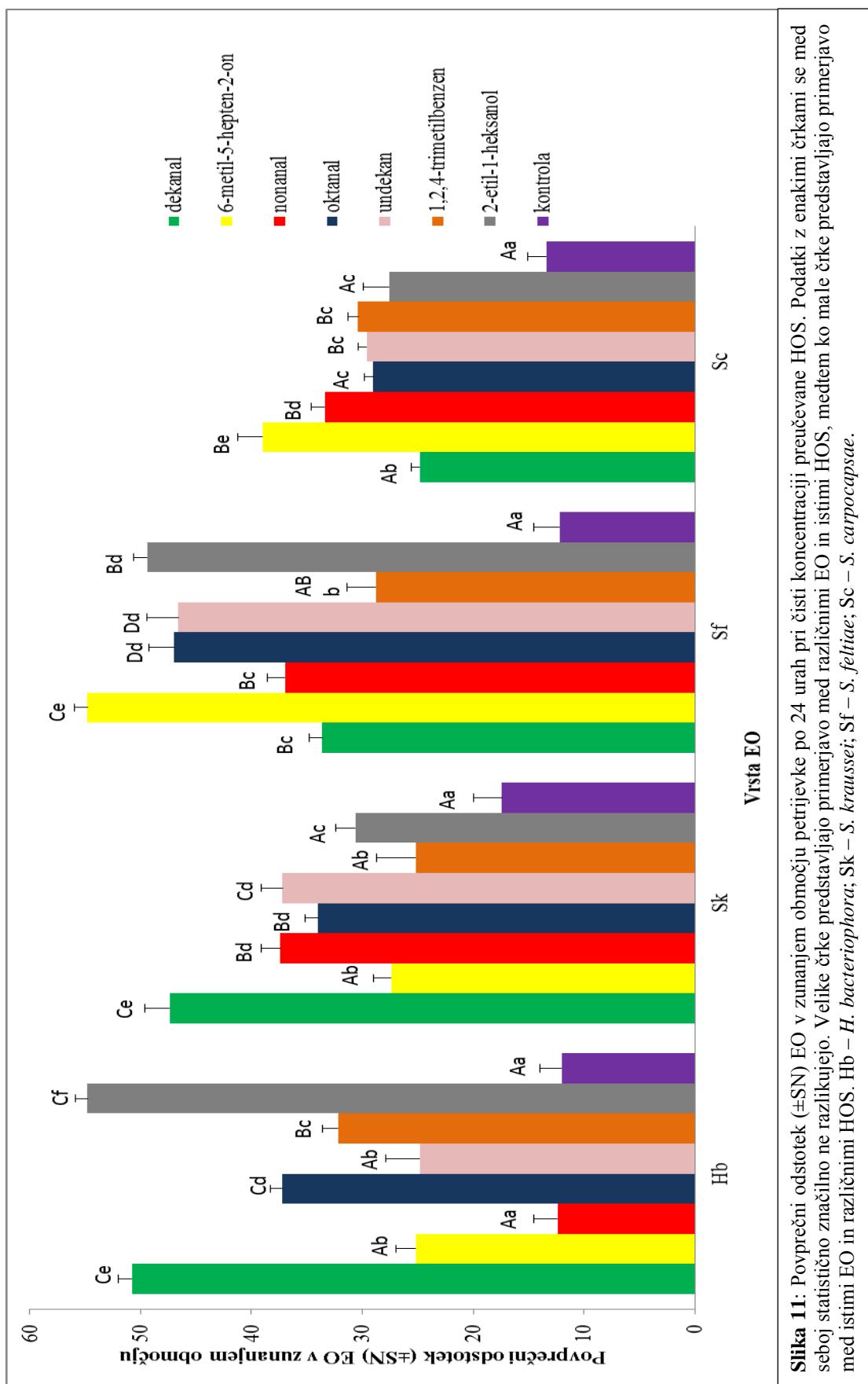


Slika 9: Vpliv strategije iskanja gostitelja na gibanje EO.

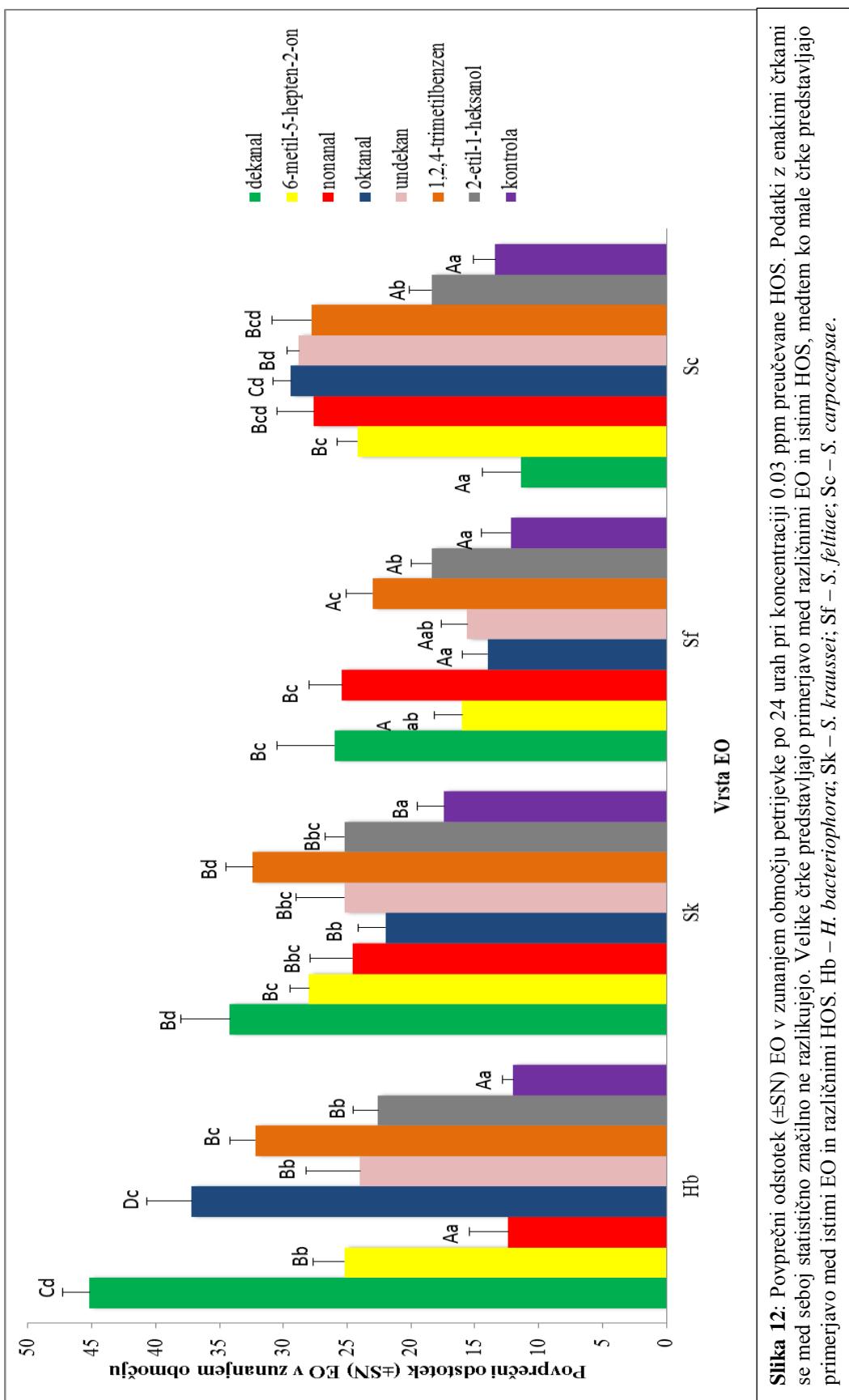
Rezultati raziskave so pokazali, da je zaznavanje kemičnih signalov vrstno specifična lastnost pri EO (slika 10). *S. carpocapsae* se je izkazala kot najmanj mobilna vrsta, saj se je po 24 urah v zunanje območje premaknilo le 13.5 ± 1.1 % IL. Med ostalimi vrstami nismo potrdili statistično značilnih razlik. Tako smo po 24 urah v zunanjem območju potrdili 20.01 ± 2.1 % EO vrste *H. bacteriophora*, 18.4 ± 1.4 % EO vrste *S. feltiae* in 17.7 ± 1.2 % EO vrste *S. kraussei* (slika 10).



Slika 10: Vpliv vrste EO na gibanje k preučevanim snovem. Legenda: Hb – *H. bacteriophora*; Sk – *S. kraussei*; Sf – *S. feltiae*; Sc – *S. carpocapsae*



Slika 11: Povprečni odstotek (\pm SN) EO v zunanjem območju petrijevke po 24 urah pri čisti koncentraciji preučevane HOS. Podatki z enakimi črkami se med seboj statistično značilno ne razlikujejo. Veliike črke predstavljajo primerjavo med različnimi EO in istimi HOS, medtem ko male črke predstavljajo primerjavo med istimi EO in različnimi HOS. Hb – *H. bacteriophora*; Sk – *S. fehliae*; Sf – *S. kraussae*.



HOS nonanal $22.4 \pm 3.0\%$, oktanal $19.8 \pm 1.8\%$ in dekanal $18.2 \pm 2.1\%$ so imele večji vpliv na gibanje EO, kot ostale preučevane snovi (sliki 11 in 12). Vpliv dekanala pri obeh koncentracijah po 24 urah je bil večji pri EO z aktivno strategijo iskanja gostitelja kot pri onih, ki iščejo svojega gostitelja pasivno oz. z vmesnim načinom. Čista koncentracija (slika 11) HOS 6-metil-1-heksanol, oktanal in undekan je bolj vplivala na gibanje EO vrste *S. feltiae* kot nižja koncentracija (slika 12).

4.2 ANALIZA KEMOTROPIČNEGA INDEKSA

Rezultati statistične analize so pokazali, da je na kemotropični indeks EO vplivalo več faktorjev in njihove medsebojne interakcije (preglednica 2).

Preglednica 2: ANOVA za vrednosti KI

Vir	F	df	P
SIG	21.70	2	<0.0001 ^a
Vrsta EO	16.35	3	<0.0001 ^a
HOS	6.11	7	<0.0001 ^a
ČI	30.99	1	<0.0001 ^a
k HOS	1.89	1	0.1695
Ponovitev	0.74	4	0.7547
SIG × HOS	7.11	14	<0.0001 ^a
SIG × ČI	6.83	2	0.0012 ^a
HOS × ČI	6.17	7	<0.0001 ^a
HOS × vrsta EO	7.03	21	<0.0001 ^a
Vrsta EO × ČI	5.38	3	<0.0012 ^a
SIG × HOS × ČI	5.26	14	<0.0001 ^a
Vrsta EO × HOS × ČI	6.32	21	<0.0001 ^a

^aStatistično značilne razlike pri $\alpha = 0.05$.

Vrsta EO je imela velik vpliv na vrednosti KI v našem poskusu. Vrednosti KI so se tako v povprečju gibale med -0.03 ± 0.01 (*S. feltiae*) in 0.04 ± 0.02 (*S. cariocapsae*). Izmed preučevanih snovi, so EO v obravnavanju dekanal dosegale največjo vrednost KI (0.06 ± 0.01), medtem ko je bilo najmanj gibanja zaznanega pri kontroli (-0.02 ± 0.01). Analiza rezultatov je pokazala, da je bilo več gibanja EO zaznanega po 24 urah (0.03 ± 0.01), kot po 2 urah (0.0 ± 0.0). Ugotovili smo tudi, da je bil KI večji za tiste EO, ki gostitelja iščejo pasivno (0.04 ± 0.01) in aktivno (0.02 ± 0.01) ter manjši za tiste EO, ki gostitelja iščejo na vmesni način (-0.03 ± 0.01). Koncentracija HOS ni statistično vplivala na vrednosti KI.

Meritve po dveh urah so pokazale le na odzivnost vrste *S. feltiae* na HOS, medtem ko se druge vrste EO niso odzivale na preučevane HOS. Oktanal je pri obeh koncentracijah deloval repellentno na vrsto *S. feltiae* (čista koncentracija: KI = -0.22 ± 0.03 ; 0.03 ppm: KI = -0.15 ± 0.08) (Preglednici 3 in 4). EO, ki iščejo gostitelja aktivno in pasivno se niso odzvale na oktanal, HOS, ki jo izločajo poškodovani gomolji krompirja (preglednici 3 in 4).

Preglednica 3: Učinek različnih HOS na KI EO pri koncentraciji 0.03 ppm ter po 2 urah izpostavljenosti.

	2-etyl-1-heksanol	dekanal	6-metil-5-hepten-2-on	nonanal
Sc	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa
Sf	0 ± 0 Ab	0 ± 0 Ab	0 ± 0 Ab	-0.02 ± 0.03 Ab
Sk	0 ± 0 Aa	0 ± 0.05 Aab	0.06 ± 0.04 Bb	-0.03 ± 0.04 Aa
Hb	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa
	oktanal	undekan	1,2,4-trimetilbenzen	kontrola
Sc	0 ± 0 Ba	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa
Sf	-0.15 ± 0.08 Aa	0 ± 0.02 Ab	0 ± 0 Ab	0 ± 0 Ab
Sk	0.05 ± 0.02 Cb	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa
Hb	0 ± 0 Ba	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa

*Vsaka podatkovna točka predstavlja povprečno vrednost $KI \pm SN$. Podatki označeni z enako črko se statistično ne razlikujejo ($P > 0.05$). Velike tiskane črke prikazujejo statistično značilne razlike med različnimi vrstami EO in enako HOS. Majhne črke označujejo statistično značilne razlike znotraj iste vrste EO in različno HOS. Hb – *H. bacteriophora*; Sk – *S. kraussei*; Sf – *S. feltiae*; Sc – *S. cariocapsae*. $KI \geq 0.2$, vpliva kot atraktant; od 0.2 do 0.1, šibek atraktant; od 0.1 do -0.1, ni učinka; od -0.1 do -0.2, šibek repellent in ≤ -0.2 , repellent za EO (Laznik in Trdan, 2013).

Preglednica 4: Učinek različnih HOS na KI EO pri čisti koncentraciji ter po 2 urah izpostavljenosti.

	2-etyl-1-heksanol	dekanal	6-metil-5-hepten-2-on	nonanal
Sc	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa
Sf	0 ± 0 Ab	0 ± 0 Ab	0 ± 0 Ab	-0.02 ± 0.04 Ab
Sk	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa
Hb	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa
	oktanal	undekan	1,2,4-trimetilbenzen	kontrola
Sc	0 ± 0 Ba	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa
Sf	-0.22 ± 0.03 Aa	0 ± 0 Ab	0 ± 0 Ab	0 ± 0 Ab
Sk	0 ± 0 Ba	0 ± 0 Aa	0.03 ± 0.02 Bb	0 ± 0 Aa
Hb	0 ± 0 Ba	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa

*glej opis pod preglednico 3.

Meritve po 24 urah so pri koncentraciji 0.03 ppm pokazale odzivnost vrste *S. feltiae* na 1,2,3-trimetilbenzen (KI = 0.12 ± 0.03), ki se je izkazal kot šibak atraktant (preglednica 5). 6-metil-5-hepten-2-on (KI = 0.16 ± 0.02), nonanal (KI = 0.19 ± 0.02), oktanal (KI = 0.15 ± 0.06) in 1,2,4-trimetilbenzen (KI = 0.1 ± 0.05) so se v naši raziskavi izkazali kot šibki atraktanti za EO vrste *S. carpocapsae* (Preglednica 5). Dekanal (KI = 0.3 ± 0.08) in oktanal (KI = 0.21 ± 0.04) sta delovala kot atraktanta za EO vrste *H. bacteriophora*, medtem ko nobena izmed preučevanih HOS ni imela vpliva na vrsto *S. kraussei* pri koncentraciji 0.03 ppm po 24 urah izpostavitve (preglednica 5).

Preglednica 5: Učinek različnih HOS na KI EO pri koncentraciji 0.03 ppm po 24 urah izpostavljenosti.

	2-etyl-1-heksanol	dekanal	6-metil-5-hepten-2-on	nonanal
Sc	-0.04 ± 0.06 ABa	0.03 ± 0 Bb	0.16 ± 0.02 Ccd	0.19 ± 0.02 Bd
Sf	-0.06 ± 0.05 Aa	0 ± 0.02 Aa	0.04 ± 0.04 Bb	-0.01 ± 0 Aa
Sk	0.06 ± 0.05 Babc	0.08 ± 0.05 Bbc	0.03 ± 0.03 Bbc	0 ± 0.04 Aab
Hb	-0.09 ± 0.06 Aa	0.3 ± 0.08 Cb	-0.02 ± 0.01 Aa	0 ± 0.06 Aa
	oktanal	undekan	1,2,4-trimetilbenzen	kontrola
Sc	0.15 ± 0.06 Bcd	0.04 ± 0.04 Aab	0.1 ± 0.05 Bc	-0.02 ± 0.06 Aab
Sf	0 ± 0.04 Aab	0.02 ± 0.03 Aab	0.12 ± 0.03 Bc	-0.06 ± 0.05 Aa
Sk	-0.02 ± 0.03 Aa	0.04 ± 0.03 Abc	0.08 ± 0.03 Bc	-0.07 ± 0.04 Aa
Hb	0.21 ± 0.04 Bb	0.02 ± 0.08 Aa	-0.03 ± 0.07 Aa	0 ± 0.05 Aa

*glej opis pod preglednico 3.

Meritve po 24 urah so pri čisti koncentraciji HOS pokazale največjo odzivnost EO. HOS 6-metil-5-hepten-2-on (KI = 0.23 ± 0.03) se je izkazala kot atraktant za EO vrste *S. carpocapsae*. Nonanal (KI = 0.16 ± 0.03) in oktanal (KI = 0.12 ± 0.04) sta na omenjeno vrsto EO delovala kot šibka atraktanta. Kot šibek repellent je na EO vrste *S. carpocapsae* delovala HOS 2-etyl-1-heksanol (KI = -0.11 ± 0.06). Kot zelo močan repellent za EO vrste *S. feltiae* se je v našem poskusu izkazala snov undekan (KI = -0.35 ± 0.02), medtem ko sta oktanal (KI = -0.19 ± 0.06) in dekanal (KI = -0.1 ± 0.03) delovala kot šibka repellenta. EO vrste *S. feltiae* je zelo šibko privlačila le snov 6-metil-5-hepten-2-on (KI = 0.14 ± 0.01). EO vrste *S. kraussei* sta v našem poskusu močno privlačili snovi dekanal (KI = 0.2 ± 0.03) in undekan (KI = 0.21 ± 0.04), medtem ko je snov nonanal (KI = 0.14 ± 0.08) delovala kot šibak atraktant. HOS dekanal (KI = 0.35 ± 0.08) in oktanal (KI = 0.21 ± 0.04) sta se izkazali kot atraktanta za EO vrste *H. bacteriophora* (preglednica 6).

Preglednica 6: Učinek različnih HOS na KI EO pri čisti koncentraciji po 24 urah izpostavljenosti.

	2-etil-1-heksanol	dekanal	6-metil-5-hepten-2-on	nonanal
Sc	-0.11 ± 0.06 Aa	0.06 ± 0.03 Bbc	0.23 ± 0.03 De	0.16 ± 0.03 Cd
Sf	-0.05 ± 0.07 ABC	-0.1 ± 0.03 Abc	0.14 ± 0.01 Ce	0 ± 0.02 Acd
Sk	0.09 ± 0 Cc	0.2 ± 0.03 Cd	-0.06 ± 0.02 Aa	0.14 ± 0.08 BCcd
Hb	0.02 ± 0.02 Ba	0.35 ± 0.08 Dc	-0.02 ± 0.01 Ba	0 ± 0.07 ABa
	oktanal	undekan	1,2,4-trimetilbenzen	kontrola
Sc	0.12 ± 0.04 Bcd	0.06 ± 0.04 Bbc	-0.04 ± 0.03 Aa	-0.02 ± 0.06 Aab
Sf	-0.19 ± 0.06 Ab	-0.35 ± 0.02 Aa	0.05 ± 0.09 Ade	-0.06 ± 0.05 Ac
Sk	-0.08 ± 0.05 Aa	0.21 ± 0.04 Cd	0.03 ± 0.04 Ab	-0.07 ± 0.04 Aa
Hb	0.21 ± 0.04 Cb	0.02 ± 0.08 Ba	-0.03 ± 0.08 Aa	0 ± 0.05 Aa

*glej opis pod preglednico 3.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Večina raziskav vezanih na področje preučevanja multitrofične komunikacije med rastlinami in drugimi organizmi (herbivori, njihovi plenilci) je bila sprva vezana le na nadzemski dele rastlin (Dicke in Sabelis, 1988; Takabayashi in Dicke, 1996). Dejstvo je temeljilo predvsem na metodoloških omejitvah (Kessler in Heil, 2011). Raziskovalci na švicarski Univerzi v Neuchâtel so kot prvi preučili vpliv HOS, ki so jih izločale korenine rastlin in njihov vpliv na gibanje koristnih organizmov (Rasmann in sod., 2005). Njihova raziskava je pokazala, da poškodovane korenine koruze izločajo snov E-β-K, ki na EO *H. megidis* deluje privabilno (kot atraktant). Številne objave kažejo, na razvoj nove veje znanosti – podzemna multitrofična komunikacija (Ali in sod., 2010; Hallem in sod., 2011, Laznik in Trdan, 2013, 2016).

V naši raziskavi smo preučevali vpliv sintetičnih HOS, ki jih izločajo poškodovani in nepoškodovani gomolji krompirja (Weissteiner, 2010). Poškodbe na gomoljih krompirja so bile povzročene z ogrci gozdnega majskega hrošča (*M. hippocastani*). V poskus je bilo vključenih 6 HOS in 4 vrste EO; *S. feltiae*, *S. kraussei*, *S. carpocapsae* in *H. bacteriophora*.

Rezultati naše raziskave so pokazali, da so se vse preučevane vrste EO odzvale na kemične signale, ki smo jih sprožili z izpostavitvijo preučevanim HOS. Največja vrednost KI je bila v našem poskusu zabeležena, ko smo EO vrste *H. bacteriophora* izpostavili čistemu dekanalu (0.35 ± 0.08). V sorodnih raziskavah (Dillman in sod., 2012; Hallem in sod., 2011) raziskovalci poročajo o vrednostih KI večjih od ± 0.5 . Do podobno majhnih vrednosti KI kot v našem poskus so prišli tudi slovenski raziskovalci (Laznik in Trdan, 2013, 2016). Razliko med rezultati tujih in domačih študij lahko pojasnimo z dejstvom, da je odziv EO na kemični signal rasno specifična lastnost (Laznik in Trdan, 2013). Ker smo v naši raziskavi uporabili enako raso EO kot sta jo Laznik in Trdan (2013) in dobili podobne vrednosti KI, potrjujemo njuno tezo. Rase EO, ki so jih uporabili tudi raziskovalci (Dillman in sod., 2012; Hallem in sod., 2011) so bile različne našim in njihov odziv na kemične signale je bil zato drugačen. Razlike v vrednostih KI v sorodnih domačih in tujih raziskavah lahko pojasnimo tudi z dejstvom, da so tudi raziskovalci (Dillman in sod., 2012; Hallem in sod., 2011) uporabili drugačne koncentracije HOS kot mi.

Rezultati naše raziskave so pokazali, da so EO razvile specifične zaznavne sisteme, s katerimi lahko razlikujejo snovi, ki jih izločajo poškodovani/nepoškodovani gomolji krompirja. Do podobnih zaključkov so prišli Ali in sod. (2011), ki so ugotovili, da EO vrst *H. indica*, *S. carpocapsae*, *S. diaprepesi* in *S. riobrave* privabljajo koreninski izločki poškodovanih korenin citrusov. Tako naša kot tuje raziskave kažejo, da je odzivnost na koreninske izločke vrstno specifična lastnost.

HOS nonanal, oktanal in dekanal so imele v našem poskusu največji vpliv na gibanje EO. Vse omenjene snovi se izločajo iz poškodovanih gomoljev krompirja in tudi nekaterih drugih rastlinskih vrst (Weissteiner, 2010). Rezulati naše raziskave so pokazali, da so omenjene snovi delovale kot atraktanti za EO, ki jih glede na njihovo strategijo iskanja gostitelja uvrščamo med aktivne (*S. kraussei*, *H. bacteriophora*) in pasivne vrste (*S. cariocapsae*). Dekanal je le na vrsto *S. feltiae* (vmesni način iskanja gostitelja) deloval kot repellent. Naši rezultati nakazujejo, da lahko EO razlikujejo kemične snovi, ki se izločajo pri napadu škodljivcev in kemične snovi, ki jih izločajo nepoškodovani/zdravi gomolji krompirja.

V sorodni raziskavi (Hallem in sod., 2011) avtorji navajajo, da HOS heptanol, heksanol in metilsalicilat (snovi izločajo poškodovane korenine citrusov) privabljajo EO vrst *H. bacteriophora* in *S. cariocapsae*. V njihovi raziskavi so se nekatere snovi izkazale kot močni repellenti. Laznik in Trdan (2016) sta odkrila, da nepoškodovani korenini korenja izločajo HOS terpinolen, ki deluje na EO repellentno. Ti rezultati nakazujejo možnost, da zdrave korenine rastlin sproščajo specifične HOS, ki sporočajo naravnim sovražnikom škodljivcev (EO) naj se ne približujejo (ne potrebujejo njihove pomoči). V naši raziskavi smo preučevali le eno HOS, ki jo izločajo nepoškodovani gomolji krompirja (2-etyl-1-heksanol). Le pri čisti koncentraciji je omenjena snov delovala kot šibak repellent za EO vrste *S. cariocapsae*. Omenjena koncentracija ne odraža realnega stanja kemičnih snovi v tleh, kjer so koncentracije HOS precej nižje. Weissteiner in sod. (2012) poročajo, da povprečne koncentracije HOS v tleh, 10 cm od koreninskega sistema, znašajo približno 0.03 ppm. Pri koncentraciji 0.03 ppm v našem poskusu, HOS 2-etyl-1-heksanol ni imel učinka na gibanje EO.

Naš poskus je pokazal, da je bilo gibanje EO proti izbrani HOS pogojeno s strategijo iskanja gostitelja. Tekom evolucije so EO razvile različne načine (strategije) iskanja svojih žuželčjih gostiteljev (Lewis, 2002; Campbell in sod., 2003). EO iščejo svojega gostitelja aktivno s premikanjem, pasivno s čakanjem nanj in na vmesni način, ki združuje lastnosti obeh načinov iskanja gostitelja. Evolucijsko se je pri EO razvil tudi tretji, t.i. vmesni način iskanja gostitelja. Gre za način, ki združuje tako pasivni kot aktivni način iskanja gostitelja, značilen predvsem za vrsto *S. feltiae* (Lewis, 2002). V našem poskusu je HOS dekanal delovala kot atraktant na EO vrsti *H. bacteriophora* in *S. kraussei*, ki sta razvili aktivni način iskanja svojega gostitelja. Najmanj mobilna je bila v našem poskusu vrsta *S. cariocapsae*. Rezultati naše raziskave potrjuje tezo, da ima strategija iskanja gostitelja velik pomen pri zaznavanju kemičnih signalov iz okolja. Bell (1991) je odkril, da je gibanje aktivnih EO na daljših razdaljah pogojeno z dojemanjem kemičnih signalov (predvsem CO₂), kar pa seveda ni lastnost EO, ki svojega gostitelja iščejo pasivno. V primerjavi z drugimi vrstami EO uporabljenih v našem poskusu, je bila *S. cariocapsae* bolj dovetna za HOS 6-metil-5-hepten-2-on. Naši rezultati potrjujejo, da je dovetnost EO za kemične dražljaje iz okolja vrstno pogojena lastnost in prevladuje nad strategijo iskanja gostiteljev EO (Laznik in Trdan 2013).

V našem poskusu smo uporabili dve koncentraciji HOS. Čista koncentracija, ki sicer ne odraža stanja v rizosferi (Köllner in sod., 2004) je znatno bolj vplivala na gibanje EO, kot koncentracija 0.03 ppm, ki odraža stanje v naravnem okolju (Weissteiner in sod., 2012). Razlika v odzivnosti EO se je najbolj izrazila pri HOS undekan. Slednji je pri čisti koncentraciji deloval kot atraktant za EO vrste *S. kraussei* in kot repellent za EO vrste *S. feltiae*. HOS undekan pri koncentraciji 0.03 ppm ni imela učinka na gibanje EO. Ugotovili smo tudi, da je bil čas izpostavljenosti EO različnim koncentracijam HOS, zelo pomemben dejavnik. Po 24 urah smo zaznali gibanje EO v 32 % poskusov, po dveh urah pa le v 2 % poskusov. Podobne rezultate so dale tudi prejšnje raziskave (Laznik in Trdan, 2013, 2016).

Večina HOS, ki sodelujejo v talnih multитrofičnih sistemih še vedno ostaja neznana. Podrobnejše razumevanje trofičnih interakcij lahko doprinese k bolj poglobljenemu razumevanju rizofsere, s poznavanjem le tega pa bo v prihodnje možno optimizirati uporabo biotičnih agensov, ki predstavljajo alternativo kemičnemu zatiranju škodljivcev v kmetijstvu in gozdarstvu (Rasmann in sod., 2012; Hiltbold in sod., 2013).

5.2 SKLEPI

- (1) Odziv EO na hlapne komponente poškodovanih/nepoškodovanih rastlin je odvisen od različnih dejavnikov; strategije iskanja gostitelja, vrste EO, vrste HOS, koncentracije HOS in časa izpostavljenosti tem snovem.
- (2) Potrjujemo, da so EO sposobne razlikovati hlapne komponente, ki jih izločajo poškodovani/nepoškodovani gomolji krompirja.
- (3) HOS nonanal, dekanal in oktanal so imele največji vpliv na gibanje EO.
- (4) *S. carpocapsae* se je izkazala kot najmanj mobilna EO v našem poskusu.
- (5) HOS dekanal deluje kot atraktant za EO vrst *H. bacteriophora* in *S. kraussei* pri obeh preučevanih koncentracijah.
- (6) Potrjujemo, da je odzivnost EO na HOS vrstno pogojena lastnost, ki prevladuje nad strategijo gibanja EO.

6 POVZETEK

V naravi rastline napadajo različni škodljivci, ki povzročajo poškodbe in s tem zmanjšajo vitalnost rastlin. Rastline se na poškodbe škodljivcev odzovejo z izločanjem HOS, kot so terpeni, derivati maščobnih kislin, fenil propanoidi in benzoidi. Izločanje teh snovi je pogojeno z vrsto škodljivca. Tla so naravni habitat EO (*Steinermatidae* in *Heterorhabdidae*), ki se jih danes vse več uporablja pri zatiranju talnih škodljivcev v kmetijstvu. EO živijo v simbiotsko-mutualističnem odnosu z bakterijami iz rodu *Xenorhabdus* in *Photorhabdus*. Ko IL EO najdejo primerenega gostitelja, vstopijo vanj skozi ustno ali zadnjično odprtino. Smrt gostitelja navadno nastopi dan ali dva po infekciji z EO. EO iščejo gostitelje na različne načine, in sicer jih lahko iščejo pasivno in aktivno, obstaja pa tudi vmesni način iskanja gostitelja. Strategija iskanja gostitelja je vrstno pogojena lastnost. EO vrst *H. bacteriophora* in *S. kraussei* svojega gostitelja iščeta aktivno, medtem ko *S. carpocapsae* svojega gostitelja čaka v zasedi (pasivno iskanje). Vrsta *S. feltiae* uporablja oba načina (pasivnega in aktivnega).

Raziskave multitrofičnih interakcij, ki vključujejo rastlino/herbivora/naravnega sovražnika predstavljajo dokaj novo vejo znanosti. Raziskave zadnjih let so pokazale, da rastline, ki izločajo v tla HOS delujejo odvračalno ali privabilno na gibanje EO. Namen naše raziskave je bil ugotoviti pomen HOS, ki jih izločajo poškodovani/nepoškodovani gomolji krompirja na gibanje EO. Rezultati naše raziskave so pokazali, da so se vse preučevane vrste EO odzvale na kemične signale, ki smo jih sprožili z izpostavitvijo preučevanim HOS. Zaključujemo, da so EO razvile specifične zaznavne sisteme, s katerimi lahko razlikujejo snovi, ki jih izločajo poškodovani/nepoškodovani gomolji krompirja. Tako naše kot tuje raziskave kažejo, da je odzivnost na koreninske izločke vrstno specifična lastnost. HOS nonanal, oktanal in dekanal so imele v našem poskusu največji vpliv na gibanje EO. Rezulati naše raziskave so pokazali, da so omenjene snovi delovale kot atraktanti za EO, ki jih glede na njihovo strategijo iskanja gostitelja uvrščamo med aktivne in pasivne vrste. Dekanal je le na vrsto *S. feltiae* deloval kot repellent. Na podlagi naših rezultatov zaključujemo, da lahko EO razlikujejo kemične snovi, ki se izločajo pri napadu škodljivcev in kemične snovi, ki jih izločajo nepoškodovani/zdravi gomolji krompirja.

V naši raziskavi smo preučevali le eno HOS, ki jo izločajo nepoškodovani gomolji krompirja (2-etil-1-heksanol). Le pri čisti koncentraciji je omenjena snov delovala kot šibak repellent za EO vrste *S. carpocapsae*. Naš poskus je pokazal, da je bilo gibanje EO proti izbrani HOS pogojeno s strategijo iskanja gostitelja. V našem poskusu je HOS dekanal delovala kot atraktant na EO vrst *H. bacteriophora* in *S. kraussei*, ki sta razvili aktivni način iskanja svojega gostitelja. Najmanj mobilna je bila v našem poskusu vrsta *S. carpocapsae*. Rezultati naše raziskave potrjuje tezo, da ima strategija iskanja gostitelja velik pomen pri zaznavanju kemičnih signalov iz okolja. V primerjavi z drugimi vrstami EO uporabljenih v našem poskusu, je bila *S. carpocapsae* bolj dovetna za HOS 6-metil-5-hepten-2-on. Naši rezultati potrjujejo, da je dovetnost EO za kemične dražljaje iz okolja vrstno pogojena lastnost in prevladuje nad strategijo iskanja gostiteljev EO.

7 VIRI

- Ali J.G., Alborn H.T., Stelinski L.L. 2010. Subterranean herbivore-induced volatiles released by Citrus roots upon feeding by *Diaprepes abbreviatus* recruit entomopathogenic nematodes. *Journal of Chemical Ecology*, 36: 361-368
- Ali J.G., Alborn H.T., Stelinski L.L. 2011. Constitutive and induced subterranean plant volatiles attract both entomopathogenic and plant parasitic nematodes. *Journal of Ecology*, 99: 26-35
- Aratchige N.S., Lesna I., Sabelis M.W. 2004. Below-ground plant parts emit herbivore induced volatiles: olfactory responses of a predatory mite to tulip bulbs infested by rust mites. *Experimental and Applied Acarology*, 33: 21-30
- Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 233-266
- Bargmann C.I., Horvitz H.R. 1991. Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron*, 7: 729-742
- Bell W.J. 1991. Searching behaviour: the behavioural ecology of finding resources. Chapman and Hall: 309 str.
- Burman M., Pye A. 1980. *Neoaplectana carpopcapsae*: movement of nematode populations on thermal gradient. *Experimental Parasitology*, 49: 258-265
- Campbell J.F., Lewis E.E., Stock S.P., Nadler S., Kaya H.K. 2003. Evolution of host search strategies in entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*, 35: 142-145
- Carson R. 1972. Nema pomlad. Moderna družba: 251 str.
- Degenhardt J. 2009. Indirect defense responses to herbivory in grasses. *Plant Physiology*, 149: 96-102
- Dicke M., Sabelis M.W. 1988. How plants obtain predatory mites as bodyguards. *Netherlands Journal of Zoology*, 38: 148-165
- Dillman A.R., Guillermin M.L., Lee J.H., Kim B., Sternberg P.W., Hallem E.A. 2012. Olfaction shapes host-parasite interactions in parasitic nematodes *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109: E2324-2333
- Flores H.E., Vivanco J.M., Loyola-Vargas V.M. 1999. 'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends in Plant Science*, 4: 220-226
- Gaugler R. 2002. Entomopathogenic nematology. CABI Publishing, New Jersey: 373 str.
- Gaugler R., Kaya H.K. 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, Florida, CRC Press: 365 str.

- Gosset V., Harmel N., Göbel C., Francis F., Haubrige E., Wathelot J.P., du Jardin P., Feussner I., Fauconnier M.L. 2009. Attacks by piercing-sucking insect (*Myzus persicae* Sultzer) or a chewing insect (*Leptinotarsa decemlineata* Say) on potato plants (*Solanum tuberosum* L.) induce differential changes in volatile compound release and oxylipin synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1231-1240
- Grewal P.S., Gaugler R., Lewis E.E. 1993. Host recognition behaviour by entomopathogenic nematodes during contact within insect gut contents. *Journal of Parasitology*, 79: 495-503
- Grewal P.S., Ehlers R.-U., Shapiro-Ilan D.I. 2005. Nematodes as biocontrol agents. Wallingford, UK, CABI Publishing: 505 str.
- Hallem E.A., Dillman A.R., Hong A.V., Zhang Y.J., Yano J.M., DeMarco S.F., Sternberg P.W. 2011. A sensory code for host seeking in parasitic nematodes. *Current Biology*, 21: 377-383
- Henry A., Doucette W., Norton J., Bugbee B. 2007. Changes in crested wheatgrass root exudation caused by flood, drought, and nutrient stress. *Journal of Environmental Quality*, 36: 904-912
- Hiltbold I., Erb M., Robert C.A.M., Turlings T.C.J. 2011. Systemic root signalling in a belowground, volatile-mediated tritrophic interaction. *Plant Cell and Environment*, 34: 1267-1275
- Hiltbold I., Bernklau E., Bjostad L.B., Alvarez N., Miller-Struttmann N.E., Lundgren J.G., Hibbard B.E. 2013. Nature, evolution and characterisation of rhizospheric chemical exudates affecting root herbivores. V: Behaviour and physiology of root herbivores. S.N. Johnson, I. Hiltbold and T.C.J. (ur.). New York, Academic Press: 97-157
- Kappers I.F., Ahroni A., Twjm van Herpen L.L.P., Luckhoff M., Dicke, Bouwmeester H.J. 2005. Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. *Science*, 309: 2070-2072
- Kessler A., Heil M. 2011. The multiple faces of indirect defences and their agents of natural selection. *Functional Ecology*, 25: 348-357
- Kocjan Ačko D., Goljat A. 2005. Krompir. Ljubljana, Kmečki glas: 175 str.
- Köllner T.G., Held M., Lenk C., Hiltbold I., Turlings T.J.C., Gershenzon J., Degenhardt J. 2008. A maize (E)-beta-caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. *Plant Cell*, 20: 482-494
- Kus M. 1994. Krompir. Ljubljana, Kmečki glas: 225 str.
- Koppenhöffer A.M., Kaya H.K. 2002. Entomopathogenic nematodes and insect pest management. *Microbial-biopesticides*, 15: 277-305
- Laznik Ž., Trdan S. 2011. Entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) in Slovenia: from tabula rasa to implementation into crop production systems. V: Insecticides –pest engineering. Perveen F (ur.). Rijeka, InTech: 627-656

- Laznik Ž., Trdan S. 2013. An investigation on the chemotactic responses of different entomopathogenic nematode strains to mechanically damaged maize root volatile compounds. *Experimental Parasitology*, 134: 349-355
- Laznik Ž., Trdan S. 2015. Failure of entomopathogens to control white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). *Acta Agriculturae Scandinavica Section B, Soil Plant Science*, 65: 95-108
- Laznik Ž., Trdan S. 2016. Attraction behaviors of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to synthetic volatiles emitted by insect damaged carrot roots. *Journal of Pest Science* (v tisku)
- Laznik Ž., Tóth T., Lakatos T., Vidrih M., Trdan S. 2010. The activity of three new strains of *Steinernema feltiae* against adults of *Sitophilus oryzae* under laboratory conditions. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 8: 132-136
- Lewis E.E. 2002. Behavioural Ecology. V: Entomopathogenic Nematology. Gaugler R. (ur.). Wallingford, UK, CABI Publishing: 205-223
- Maron J.L., Kauffman M.J. 2006. Habitat-specific impacts of multiple consumers on plant population dynamics. *Ecology*, 87: 113-124
- Milevoj L. 2007. Kmetijska entomologija: splošni del. Ljubljana, Biotehniška fakultete Univerze v Ljubljani: 182 str.
- Mumm R., Dicke M. 2010. Variation in natural plant products and the attraction of bodyguards involved in indirect plant defense. *Canadian Journal of Zoology*, 88: 628-667
- Nguyen K.B., Hunt D.J. 2007. Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts. *Nematology monographs and perspectives*: 816 str.
- O'Halloran D.M., Burnell A.M. 2003. An investigation of chemotaxis in the insect parasitic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Parasitology*, 127: 375-385
- Rasmann S., Köllner T.G., Degenhardt J., Hiltpold I., Toepfer S., Kuhlmann U., Gershenzon J., Turlings T.C.J. 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 434: 732-737
- Rasmann S., Turlings T.C.J. 2008. First insights into specificity of belowground tritrophic interactions. *Oikos*, 117: 362-369
- Rasmann S., Hiltpold I., Ali J. 2012. The role of root-produced volatile secondary metabolites in mediating soil interactions. V: *Advances in selected plant physiology aspects*. Montanaro, G., Cichio, B. (ur.). Rijeka, InTech: 269-290
- Rinchow H.H., Meckenstock R.U., Retzel L.A., Baun A., Ledin A., Christensen T.H. 2003. In situ biodegradation determined by carbon isotope fractionation of aromatic hydrocarbons in an anaerobic landfill leachate plume. *Journal of Contaminant Hydrology*, 64: 59-72
- Rohloff J. 2002. Volatiles from rhizomes of *Rhodiola rosea* L. *Phytochemistry*, 59: 655-661

- Rostas M., Eggert K. 2008. Ontogenetic and spatio-temporal patterns of induced volatiles in *Glycine max* in the light of the optimal defence hypothesis. *Chemoecology*, 18: 29-38
- Schnee C., Köllner T.G., Held M., Turlings T.J.C., Gershenzon J., Degenhardt J. 2006. The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103: 1129-1134
- Shapiro-Ilan D., Lewis E.E., Campbell J.F., Kim-Shapiro D.B. 2012. Directional movement of entomopathogenic nematodes in response to electrical field: effect of species, magnitude of voltage, and infective juvenile age. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109: 34-40
- Thaler J.S. 1999. Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism of herbivores. *Nature*, 399: 686-688
- Takabayashi J., Dicke M. 1996. Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trends in Plant Science*, 1: 109-113
- Turlings T.C.J., Hiltbold I., Rasman S. 2012. The importance of root-produced volatiles as foraging cues for entomopathogenic nematodes. *Plant and Soil*, 359: 51-60
- Urek G., Hržič A. 1998. Ogročice nevidni zajedavci rastlin: fitoentomologija. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 240 str.
- Vodnik D. 2012. Osnove fiziologije rastlin. Ljubljana, Oddelek za agronomijo, Biotehniška fakulteta: 139 str.
- Weissteiner S. 2010. The effect of root volatiles on the orientation behavior of cockchafer larvae in the soil. Dissertation thesis. Göttingen, Georg-August-University-Göttingen: 182 str.
- Weissteiner S., Huetteroth W., Kollmann M., Weißbecker B., Romani R., Schachtner J., Schütz S. 2012. Cockchafer larvae smell host root scents in soil. *PLOS ONE*, 7: e45827, doi: 10.1371/journal.pone.0045827: 12 str.
- Wenke K., Kai M., Piechulla B. 2010. Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. *Planta*, 231: 499-506

ZAHVALA

Zahvalila bi se rada svojim staršem, ki so mi omogočili študij, mi stali ob strani in mi nudili podporo v najtežjih trenutkih. Zahvaljujem se tudi svojemu bratu, dedku, teti, stricu in bratruancu, ki so bili vedno pripravljeni pomagati pri procesih mojega študija. Brez njih mi ne bi uspelo. Zahvaljujem se tudi vsem prijateljicam, ki so na kakršenkoli način pripomogle pri mojem študiju in nastanku magistrskega dela.

Nenazdanje gre prav posebna zahvala mojemu mentorju za nesebično pomoč in podporo, za moralno spodbudo, za dostopnost in strokovnost. Hvala, ker ste vedno potrpežljivo čakali na moje delo.