

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Žiga LAZNIK

**LABORATORIJSKO PREUČEVANJE  
UČINKOVITOSTI ŠTIRIH VRST  
ENTOMOPATOGENIH OGORČIC (*Rhabditida*) ZA  
ZATIRANJE KAPUSOVH BOLHAČEV  
(*Phyllotreta* spp., Coleoptera, Chrysomelidae)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Žiga LAZNIK

**LABORATORIJSKO PREUČEVANJE UČINKOVITOSTI ŠTIRIH VRST  
ENTOMOPATOGENIH OGORČIC (Rhabditida) ZA ZATIRANJE  
KAPUSOVIH BOLHAČEV (*Phyllotreta* spp., Coleoptera, Chrysomelidae)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**RESEARCH ON EFFICACY OF FOUR ENTOMOPATHOGENIC  
NEMATODE SPECIES (Rhabditida) AGAINST ADULTS OF FLEA  
BEETLES (*Phyllotreta* spp., Coleoptera, Chrysomelidae) UNDER  
LABORATORY CONDITIONS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo v entomološkem laboratoriju na Katedri za entomologijo in fitopatologijo Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Odrasle osebkke kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) smo nabrali na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Stanislava Trdana.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: akad. prof. dr. Ivan KREFT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Stanislav TRDAN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Jože OSVALD  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Žiga Laznik

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 632.76:632.651:632.937.1.03(043.2)
KG	laboratorijska raziskava/entomopatogene ogorčice/ <i>Steinernema feltiae</i> / <i>Steinernema carpocapsae</i> / <i>Heterorhabditis megidis</i> / <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> /zatiranje/kapusovi bolhači/ <i>Phyllotreta</i> spp./učinkovitost/biotično varstvo/škodljivci/predatorji
KK	AGRI H01/H10
AV	LAZNIK, Žiga
SA	TRDAN, Stanislav (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddeleke za agronomijo
LI	2006
IN	LABORATORIJSKO PREUČEVANJE UČINKOVITOSTI ŠTIRIH VRST ENTOMOPATOGENIH OGORČIC (Rhabditida) ZA ZATIRANJE KAPUSOVIH BOLHAČEV ( <i>Phyllotreta</i> spp., Coleoptera, Chrysomelidae)
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 65 str., 2 pregl., 13 sl., 57 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V laboratorijskem poskusu smo preizkušali učinkovitost štirih vrst entomopatogenih ogorčic ( <i>Steinernema feltiae</i> , <i>S. carpocapsae</i> , <i>Heterorhabditis megidis</i> , <i>H. bacteriophora</i> ) za zatiranje odraslih osebkov kapusovih bolhačev ( <i>Phyllotreta</i> spp.). Aktivnost biotičnih agensov smo preizkušali pri treh različnih koncentracijah (200, 1000 in 2000 infektivnih ličink/osebek) in temperaturah (15, 20 in 25°C). Smrtnost hroščkov smo preverjali 2, 4, 6 in 8 dni po aplikaciji ogorčic. Vpliv temperature na aktivnost ogorčic je bil večji od vpliva koncentracije suspenzije. Učinkovitost entomopatogenih ogorčic je bila pri 20 in 25°C večja kot pri 15°C. Osmi dan po tretiranju je bila vrsta <i>Steinernema carpocapsae</i> (LD <sub>50</sub> = 310-1193 infektivnih ličink/osebek) najbolj učinkovita pri 20°C, medtem ko je bila ogorčica <i>S. feltiae</i> najbolj učinkovita pri najnižji temperaturi in ima zaradi tega velike možnosti za zatiranje kapusovih bolhačev na prostem.



## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 632.76:632.651:632.937.1.03(043.2)  
CX laboratory conditions/entomopathogenic nematodes/ *Steinernema feltiae*/  
*Steinernema carpocapsae*/*Heterorhabditis megidis*/*Heterorhabditis*  
*bacteriophora*/biotic control/flea beetles/*Phyllotreta* spp./efficacy/predators  
CC AGRIS H01/H10  
AU LAZNIK, Žiga  
AA TRDAN, Stanislav (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy  
PY 2006  
PI RESEARCH ON EFFICACY OF FOUR ENTOMOPATHOGENIC  
NEMATODE SPECIES (Rhabditida) AGAINST ADULTS OF FLEA  
BEETLES (*Phyllotreta* spp., Coleoptera, Chrysomelidae) under laboratory  
conditions  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO X, 65 p., 2 tab., 13 fig., 57 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Four entomopathogenic nematode species (*Steinernema feltiae*, *S.*  
*carpocapsae*, *Heterorhabditis bacteriophora*, and *H. megidis*) were tested in  
a laboratory bioassay with the aim of studying their activity in controlling  
adult flea beetles, *Phyllotreta* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae). Activity of  
the biological agents studied was determined at three different  
concentrations (200, 1000, and 2000 IJs per adult) and temperatures (15, 20,  
and 25°C). Mortality of the beetles was determined 2, 4, 6, and 8 d after  
treatment. Temperature exerted stronger influence on activity of  
entomopathogenic nematodes than did concentration of the suspension.  
Efficacy of the nematodes was higher at 20 and 25°C than at 15°C. Eight  
days after treatment, *S. carpocapsae* (LC<sub>50</sub> = 310-1193 IJs/adult) was the  
most efficient at 20°C, while *S. feltiae* (LC<sub>50</sub> = 156-1304 IJs/adult) showed  
the highest efficacy at 25°C. *Steinernema feltiae* was also the most efficient  
at the lowest temperature (LC<sub>50</sub> = 483-1467 IJs/adult), and it is therefore  
considered to have the highest potential for flea beetle control in the open.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	X
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 POVOD ZA DELO	1
1.2 CILJ RAZISKAVE	2
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 ZGODOVINA UPORABE ENTOMOPATOGENIH OGORČIC	3
2.2 SISTEMATIKA ENTOMOPATOGENIH OGORČIC	4
<b>2.2.1 Deblo Nemata</b>	<b>4</b>
<b>2.2.2 Vrste entomopatogenih ogorčic iz rodu <i>Heterorhabditis</i></b>	<b>5</b>
2.2.2.1 <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	5
2.2.2.2 <i>Heterorhabditis megidis</i>	5
<b>2.2.3 Vrste entomopatogenih ogorčic iz rodu <i>Steinernema</i></b>	<b>5</b>
2.2.3.1 <i>Steinernema carpocapsae</i>	6
2.2.3.2 <i>Steinernema feltiae</i>	6
2.3 DVOSPOLNIKI IN ENOSPOLNIKI	6
<b>2.3.1 Razlike med rodovima <i>Steinernema</i> in <i>Heterorhabditis</i></b>	<b>7</b>
2.4 RAZVOJNI KROG ENTOMOPATOGENIH OGORČIC	7
2.5 ODNOSI MED OGORČICAMI IN ŽUŽELKAMI	10
<b>2.5.1 Načini parazitiranja</b>	<b>11</b>
<b>2.5.2 Obrambni odgovor žuželk na parazitiranje entomopatogenih ogorčic</b>	<b>11</b>
2.6 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA PREŽIVETJE ENTOMOPATOGENIH OGORČIC	12
<b>2.6.1 Biotski in abiotski dejavniki</b>	<b>12</b>
<b>2.6.2 Naravni sovražniki entomopatogenih ogorčic</b>	<b>14</b>
2.7 GIBANJE ENTOMOPATOGENIH OGORČIC	15
2.8 PROIZVODNJA ENTOMOPATOGENIH OGORČIC	16
<b>2.8.1 Formulacija entomopatogenih ogorčic</b>	<b>17</b>
<b>2.8.2 Formulacija za shranjevanje in transport</b>	<b>17</b>
2.9 ENTOMOPATOGENE OGORČICE IN GENETIKA	18
<b>2.9.1 Metode genskih izboljšav</b>	<b>20</b>
2.9.1.1 Selektivno križanje	20
2.9.1.2 Mutageneza	23
2.9.1.3 Genski inženiring	23
<b>2.9.2 Cilji genskih izboljšav</b>	<b>24</b>
2.9.2.1 Učinkovitost	25

2.9.2.2	Odpornost na okoljske ekstreme	25
2.9.2.3	Anhidrobiotične vrste	26
2.10	<b>SIMBIONTSKE BAKTERIJE ENTOMOPATOGENIH OGORČIC</b>	27
<b>2.10.1</b>	<b>Sistematika</b>	27
2.10.1.1	Rod <i>Xenorhabdus</i>	27
2.10.1.2	Rod <i>Photorhabdus</i>	27
<b>2.10.2</b>	<b>Razlike in podobnosti med rodovoma <i>Xenorhabdus</i> in <i>Photorhabdus</i></b>	28
2.10.2.1	Razlike	28
2.10.2.2	Podobnosti	28
<b>2.10.3</b>	<b>Entomopatogene ogorčice in njihove simbiotske bakterije</b>	28
<b>2.10.4</b>	<b>Razmnoževanje simbiotskih bakterij</b>	31
<b>2.10.5</b>	<b>Virulentnost simbiotskih bakterij in vloga entomopatogenih ogorčic</b>	31
<b>2.10.6</b>	<b>Metabolizem simbiotskih bakterij in simbioza z ogorčicami</b>	32
<b>2.10.7</b>	<b>Simbiotske bakterije in genetika</b>	32
2.10.7.1	Uvod v raziskave	32
2.10.7.2	Cilji izboljšav	33
2.10.7.3	Gensko tveganje	36
2.11	<b>UČINKOVITOST ENTOMOPATOGENIH OGORČIC</b>	38
2.12	<b>KAPUSOV BOLHAČ (<i>Phyllotreta</i> spp.)</b>	40
<b>2.12.1</b>	<b>Opis</b>	40
<b>2.12.2</b>	<b>Razširjenost, širjenje in gostitelji</b>	41
<b>2.12.3</b>	<b>Poškodbe</b>	41
<b>2.12.4</b>	<b>Razvojni krog</b>	41
<b>2.12.5</b>	<b>Varstvo</b>	42
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE DELA</b>	44
3.1	ENTOMOPATOGENE OGORČICE	44
3.2	SHRANJEVANJE OGORČIC	44
3.3	DOLOČEVANJE KONCENTRACIJE OGORČIC	45
3.4	KAPUSOVI BOLHAČI ( <i>Phyllotreta</i> spp.)	45
3.5	POTEK RAZISKAVE	45
3.6	STATISTIČNA ANALIZA	46
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	50
4.1	SKUPINSKA ANALIZA	50
4.2	INDIVIDUALNA ANALIZA	50
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	56
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	58
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	61
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Entomopatogene ogorčice in njihove simbiotske bakterije (Kaya, 2000)	str. 30
Preglednica 2: Izračunane vrednosti $LC_{50}$ in $LC_{90}$ za štiri različne vrste entomopatogenih ogorčic pri treh različnih temperaturah osmi dan po tretiranju	55

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Razvojni krog entomopatogenih ogorčic (Koppenhöfer in Kaya, 2002)	9
Slika 2: Sistem selektivnega križanja	22
Slika 3: Kapusov bolhač ( <i>Phyllotreta</i> spp.) (foto: M. Jeran)	43
Slika 4: Progasti kapusov bolhač ( <i>Phyllotreta undulata</i> Kutsch.) (foto: M. Jeran)	43
Slika 5: Lovljenje kapusovih bolhačev na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani (foto: M. Jeran)	47
Slika 6: Kapusov bolhač v petrijevki (foto: M. Jeran)	47
Slika 7: Kapusovi bolhači v petrijevkah v različnih obravnavanjih (foto: M. Jeran)	48
Slika 8: Ocenjevanje učinkovitosti entomopatogenih ogorčic v entomološkem laboratoriju na Katedri za entomologijo in fitopatologijo (foto: M. Jeran)	48
Slika 9: Gojivna komora tipa RK-900 CH v entomološkem laboratoriju na katedri za Entomologijo in fitopatologijo (foto: M. Jeran)	49
Slika 10: Entomološki laboratorij na Katedre za entomologijo in fitopatologijo (foto: M. Jeran)	49
Slika 11: Smrtnost odraslih osebkov kapusovih bolhačev ( <i>Phyllotreta</i> spp.) 2, 4, 6 in 8 dni po tretiranju s tremi različnimi koncentracijami štirih vrst entomopatogenih ogorčic pri 15 °C	52
Slika 12: Smrtnost odraslih osebkov kapusovih bolhačev ( <i>Phyllotreta</i> spp.) 2, 4, 6 in 8 dni po tretiranju s tremi različnimi koncentracijami štirih vrst entomopatogenih ogorčic pri 20 °C.	53
Slika 13: Smrtnost odraslih osebkov kapusovih bolhačev ( <i>Phyllotreta</i> spp.) 2, 4, 6 in 8 dni po tretiranju s tremi različnimi koncentracijami štirih vrst entomopatogenih ogorčic pri 25 °C	54

## KAZALO PRILOG

- Priloga A: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) pri 15°C
- Priloga A1: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Steinernema carpocapsae*
- Priloga A2: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Steinernema feltiae*
- Priloga A3: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Heterorhabditis bacteriophora*
- Priloga A4: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Heterorhabditis megidis*
- Priloga B: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) pri 20°C.
- Priloga B1: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Steinernema carpocapsae*
- Priloga B2: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Steinernema feltiae*
- Priloga B3: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Heterorhabditis bacteriophora*
- Priloga B4: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Heterorhabditis megidis*
- Priloga C: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) pri 25°C.
- Priloga C1: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Steinernema carpocapsae*
- Priloga C2: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Steinernema feltiae*
- Priloga C3: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Heterorhabditis bacteriophora*
- Priloga C4: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Heterorhabditis megidis*

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

sod.	sodelavci
IJ	infektivne ličinke
t.j.	to je
oz.	oziroma

## 1 UVOD

### 1.1 POVOD ZA DELO

Integriranega varstva rastlin ne smemo in ne moremo enačiti z organskim pridelovanjem hrane, ki je v očeh nekaterih potrošnikov edini način pridelave zdrave hrane. Potrošnik mora imeti možnost izbrati med organsko pridelano hrano in hrano, pridelano z uporabo drugih tehnologij z manjšim tveganjem in manjšimi stroški. Sistem državnega nadzora pa mora zagotavljati, da je hrana, pridelana z uporabo nekaterih sintetičnih snovi, prav tako neoporečna in zdrava (Milevoj, 2002).

Največ dvomov potrošnikov se poraja v zvezi z uporabo sredstev za varstvo rastlin pred boleznimi, škodljivci in pleveli. Prvo načelo integriranega varstva je, da naj pridelovalec hrane uporabi fitofarmaceutvska sredstva šele, ko drugi tehnološki ukrepi ne zadoščajo več. Pri tem so dovoljeni le manj strupeni in hitreje razgradljivi pripravki.

Eden od okoljsko sprejemljivih ukrepov je tudi biotično zatiranje škodljivcev gojenih rastlin. Zanj je značilno, da uporablja žive naravne sovražnike, antagonist ali kompetitorje oz. njihove produkte in druge organizme, ki se morajo sami razmnoževati, za zmanjšanje škodljivosti fitofagnih žuželk in drugih škodljivih organizmov. Pomemben sestavni del integriranega varstva rastlin je tudi spodbujanje delovanja naravnih sovražnikov in zmanjšanje uporabe kemičnih pripravkov, zato zlasti v zadnjem času vse bolj pridobivajo na pomenu biotični pripravki.

Uporaba biotičnih pripravkov zahteva več znanja uporabnikov in tudi njihovo večjo ekološko osveščenost. Pripravki, izdelani na biotični podlagi, so ekološko ustreznejši, njihovo delovanje je bolj specifično, pomembna je njihova formulacija in aplikacija ter natančnost rokov tretiranja. Po drugi strani pa je njihova učinkovitost večkrat manjša od tiste pri kemičnih pripravkih (Milevoj, 2002).

Prve raziskave ugotavljanja učinkovitosti delovanja entomopatogenih ogorčic (nematod) za zatiranje rastlinskih škodljivcev so v Sloveniji že bile izvedene. Ker entomopatogene ogorčice v slovenskem naravnem okolju še vedno predstavljajo "eksotične agense", so bile vse dosedanje raziskave izvedene v laboratoriju. Ob prvi najdbi entomopatogenih ogorčic v naravnem okolju, ki ga ob nadaljevanju raziskav teh organizmov lahko pričakujemo v bližnji prihodnosti, pa bo mogoče raziskave iz laboratorijev prenesti tudi na prosto. V svetovnem merilu uporaba entomopatogenih ogorčic v biotičnem varstvu rastlin ni novost, saj spadajo med najbolj preučevane biotične agense za zatiranje talnih škodljivcev.

Novost našega pristopa je bil izbor škodljivca, saj smo želeli preučiti delovanje entomopatogenih ogorčic na žuželko, ki povzroča škodo na nadzemskih delih vrtnin. V Sloveniji je ta pristop prvič izvedla Simona Perme (2005), ki je v svoji magistrski nalogi preučevala delovanje štirih vrst entomopatogenih ogorčic za zatiranje nadzemnih



škodljivcev, in sicer ličink cvetličnega resarja (*Frankliniella occidentalis* [Pergende]), odraslih osebkov rastlinjakovega ščitkarja (*Trialeurodes vaporariorum* [Westwood]) in ličink koloradskega hrošča (*Leptinotarsa decemlineata* [Say]). Naše delo je nadaljevanje njenega, saj smo iste štirih vrste entomopatogenih ogorčic preizkušali v delovanju na odrasle osebkove kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.).

Entomopatogene ogorčice so organizmi, katerih razvoj je vezan na tla, kjer se razmnožujejo in hranijo. Dosedanje raziskave učinkovitosti omenjenih agensov so potekale zlasti na talnih škodljivcih (Hazir in sod., 2003). Uporaba entomopatogenih ogorčic za zatiranje nadzemskih škodljivcev pomeni precejšnjo novost v biotičnem varstvu rastlin. Namen naše raziskave je bil v laboratorijskih razmerah preučiti učinkovitost štirih vrst entomopatogenih ogorčic (*Steinernema feltiae* [Filipjev], *Steinernema carpocapsae* [Weiser], *Heterorhabditis bacteriophora* [Poinar] in *Heterorhabditis megidis* [Poinar]) za zatiranje odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.), škodljivcev nadzemskih delov kapusnic.

## 1.2 CILJ RAZISKAVE

V raziskavi smo želeli preučiti vpliv različnih okoljskih dejavnikov na učinkovitost delovanja štirih vrst entomopatogenih ogorčic za zatiranje odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) Učinkovitost njihovega delovanja smo ugotavljali pri različnih koncentracijah suspenzije ogorčic (0 - kontrola, 1000, 5000 in 10000 ogorčic/ml destilirane vode); pri različnih temperaturah (15, 20 in 25 °C), pri stalni relativni zračni vlagi (95 %) in pri stalnem razmerju med svetlobo in temo v gojitveni komori (0:24). Vzrok slednjega parametra je mogoče razložiti iz fiziološkega odgovora entomopatogenih ogorčic na svetlobo, saj je ultravijolično sevanje omejujoč dejavnik njihovega razvoja.

S hkratnim preučevanjem večjega števila abiotičnih (neživih) in biotičnih (živih) dejavnikov, smo želeli pridobiti čim več podatkov o delovanju in učinkovitosti entomopatogenih ogorčic pri zatiranju kapusovih bolhačev.

Z diplomsko nalogo želimo tako prispevati k boljšemu razumevanju delovanja različnih vrst entomopatogenih ogorčic, s poudarkom na zatiranju nadzemskih škodljivcev vrtnin. Varovanje okolja je naša pomembna skrb in z uporabo entomopatogenih ogorčic, kot alternative obstoječim, konvencionalnim, »orožjem« zoper škodljive organizme, smo na pravi poti, da okolje ohranimo čimbolj čisto, skrb zanj pa prepustimo prihodnjim rodovom.

## 1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevamo, da so različne vrste entomopatogenih ogorčic različno učinkovite za zatiranje preučevanih žuželk, ki so pri nas pomembni škodljivci kapusnic.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGODOVINA UPORABE ENTOMOPATOGENIH OGORČIC

Že v 17. stoletju je bilo znano, da lahko ogorčice parazitirajo žuželke, vendar pa se je šele v 30-ih letih prejšnjega stoletja znanost prvič resneje začela ukvarjati z njimi, kot možnim načinom biotičnega varstva rastlin. Entomopatogene ogorčice so začeli uporabljati za varstvo rastlin pred škodljivimi žuželkami na rastlinah v 30-ih in v začetku 40-ih let prejšnjega stoletja, ko so s tovrstnimi raziskavami začeli ameriški entomologi Glaser, Fox in Steiner (Gaugler in Kaya, 1990).

Leta 1929 sta Glaser in Fox odkrila ogorčico, ki je napadla hrošča *Popillia japonica* (Smart, 1995). Istega leta je Steiner poimenoval to ogorčico z imenom *Steinernema glaseri*. Vsi trije znanstveniki se niso zavedali, da je bila glavni povzročitelj smrti omenjenega hrošča simbiotska bakterija, ki živi z entomopatogeno ogorčico v mutualističnem odnosu. Glaser je vpeljal metodo gojenja entomopatogenih ogorčic »*in vitro*«, ki je bila primerna tudi za razmnoževanje simbiotskih bakterij. S tako vzgojenimi ogorčicami je leta 1939 izvedel prvi poljski poskus v New Jersey-ju za zatiranje hrošča *Popillia japonica*.

To izjemno odkritje je bilo zaradi intenzivne uporabe kemičnih sredstev za varstvo rastlin pozabljeno vse do 70-ih let prejšnjega stoletja, ko so v javnost prišle informacije o njihovi strupenosti. Ugotovljeno je bilo, da klorirani ogljikovodiki (na primer insekticid DDT), ki so se množično uporabljali do tedaj, močno onesnažujejo okolje. Zaradi prevelikih količin DDT, se je ta začel prenašati prek prehranjevalne verige in je povzročil skoraj da izumrtje nekaterih vrst živali (ptiči). Vsa ta dejstva je Rachel Carson opisala v knjigi *Nema pomlad* (Gaugler, 2002).

Strokovnjaki iz področja varstva rastlin so spoznali, da je potrebno nekaj temeljito spremeniti. Odtlej so številne raziskave vezane na nove načine varstva rastlin, med katere štejemo tudi biotično varstvo. Ideja o biotičnem zatiranju škodljivih žuželk z entomopatogenimi ogorčicami je ponovno zaživela.

Kar je bilo še pred 30 leti zgolj laboratorijsko delo, je danes že uporabna znanost na poljih. V več kot 60 državah sveta znanstveniki raziskujejo entomopatogene ogorčice in njihove simbiotske bakterije. Na Floridi (ZDA) z omenjenimi ogorčicami vsako leto tretirajo citruse na 25.000 ha. Na različnih območjih ZDA entomopatogene ogorčice uporabljajo tudi za zatiranje škodljivcev brusnic, artičok, gojenih gob, jabolk, breskev, travne ruše in nekaterih drugih gojenih rastlin. Entomopatogene ogorčice pa so zanimive tudi za raziskave v nekaterih drugih področjih znanosti, na primer v biotehnologiji, genetiki in medicini (Gaugler, 2002).

Vse kaže, da je pionirsko delo Glaserja, Foga, Steinerja in ostalih znanstvenikov pripeljalo entomološko znanost v neko novo razsežnost. Ker pa nobena stvar ni popolna, se tudi varstvo rastlin z entomopatogenimi ogorčicami srečuje z mnogimi problemi, med katerimi bi izpostavil le enega. Raziskave v mnogih državah sveta so omejene le na laboratorijsko delo z ogorčicami, ne pa tudi z njihovo uporabnostjo na poljih. Vzrok je v dejstvu, da so ogorčice v številnih državah še vedno t.i. »eksotični agensi«, ker še niso bile najdene v naravnem okolju. Zato je pred nami še veliko dela, če želimo da bo ideja Steinerja in ostalih zares zaživela in se bo uporaba entomopatogenih ogorčic razširila tudi na prosto.

## 2.2 SISTEMATIKA ENTOMOPATOGENIH OGORČIC

Deblo: Nemata

Razred: Secrenentea

Podrazred: Rhabditia

Red: Rhabditida

Podred: Rhabditina

Naddružina: Rhabditoidea

Družina: Steinernematidae (rodova: *Steinernema*, *Neosteinernema*)

Družina: Heterorhabditidae (rod: *Heterorhabditis*)

### 2.2.1 Deblo Nemata

Izraz »nematoda«, ki smo ga poslovenili v ogorčica, prihaja iz grških besed »nema« (nit) in »toid« (oblika). Ogorčice so talni organizmi, ki v dolžino merijo od 0,1 mm do več metrov (Kaya in Köppenhofer, 1999). Gre za agense, ki za obstoj nujno potrebujejo večjo vlago. Ker so jih dosedaj našli na vseh celinah, razen na Antarktiki, jih uvrščamo med kozmopolite. Ti organizmi so sposobni živeti tudi v najbolj ekstremnih razmerah.

Ogorčice imajo prebavila, mišice, enostavni izločalni in živčni sistem, kot tudi razmnoževalne organe, nimajo pa čutil za vid in sluh ter dihalnega in cirkulacijskega sistema. Pri večini vrst sta spola ločena. Večina ogorčic je prostoživečih, nekatere vrste pa lahko živijo kot paraziti rastlin ali živali. Najdemo jih tako v sladki kot morski vodi.

Po obliki so ogorčice bilateralno simetrične, podolgovate in nečlenasto oblikovane živali, katerih telo je pokrito s kutikulo hipodermalnega izvora. Vrste se razlikujejo tudi po obliki telesa. Sprednji del je navadno zaokrožen, na njegovem skrajnem delu je največkrat ustna odprtina z značilnimi izrastki v obliki papil in set. Ustni odprtini sledi črevo, ki se končuje s kloako pri samcih oziroma z zadnjično odprtino pri samicah (Gaugler, 2002).

## 2.2.2 Vrste entomopatogenih ogorčic iz rodu *Heterorhabditis*

Leta 1976 je Poinar opisal prvo ogorčico iz rodu *Heterorhabditis* in jo poimenoval *Heterorhabditis bacteriophora*. Uvrstil jo je v novo družino Heterorhabditidae. V to družino štejemo le en rod - *Heterorhabditis*, vanj pa je bilo doslej uvrščenih 13 vrst ogorčic. Za primerjavo, v letu 2002 je bilo znanih le 8 vrst entomopatogenih ogorčic iz tega rodu, kar potrjuje dejstvo, da gre za bolj preučevane organizme v zadnjem obdobju.

V rod *Heterorhabditis* tako danes štejemo vrste: *Heterorhabditis argentinensis*, *H. bacteriophora*, *H. baujardi*, *H. brevicaudis*, *H. downesi*, *H. floridensis*, *H. hawaiiensis*, *H. indica*, *H. marelatus*, *H. megidis*, *H. mexicana*, *H. taysearae* in *H. zealandica* (Kgyugen, 2006).

### 2.2.2.1 *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar)

Ogorčica *Heterorhabditis bacteriophora* išče svoje žrtve aktivno. To so zlasti gosenice in ličinke hroščev. Vrsta zelo učinkovito parazitira rilčkarje (Curculionidae) (Peters, 1996a; Gaugler, 1999, Koppenhöfer, 2000). Učinkovitost delovanja ogorčic je slabša, ko talna temperatura pade pod 20°C. Gre za zelo slabo stabilno vrsto, saj je njena življenjska doba v pripravkih zelo kratka, po nanosu pa ohranja aktivnost le nekaj dni (Gaugler, 1999). Odrasla ogorčica je dolga 588 µm in široka 23 µm. Infektivna ličinka (stadij, ki je edini sposoben parazitiranja; IJ) pa meri v dolžino 512-671 µm in v širino 18-31 µm (Gaugler, 2002). Živi v sožitju z bakterijo *Photorhabdus luminescens*.

### 2.2.2.2 *Heterorhabditis megidis* (Poinar)

Vrsta je zelo učinkovita pri parazitiranju rilčkarja *Otiorynchus sulcatus* (Fabricius) (Peters, 1996a; Gaugler 1999; Koppenhöfer, 2000). Odrasel osebek meri v dolžino 768 µm in v širino 28 µm. Infektivni stadij meri v dolžino 736-800 µm in v širino 27-32 µm. (Gaugler, 2002). Ogorčica živi v simbiotsko mutualističnem odnosu z bakterijo *Photorhabdus temperata*.

## 2.2.3 Vrste entomopatogenih ogorčic iz rodu *Steinernema*

Po odkritju prve ogorčice iz omenjenega rodu *Steinernema glaseri* (1929), se je intenzivnost iskanja novih vrst ogorčic začela naglo povečevati. Rod *Steinernema* uvrščamo v družino Steinernematidae, ki jo sestavljata dva rodova, in sicer rod *Steinernema* ter rod *Neosteinernema*. Iz rodu *Steinernema* je bilo doslej najdenih 49 vrst ogorčic. Samo v letu 2002 je bilo najdenih 26 vrst, kar daje slutiti, da se bo v prihodnjih letih njihovo število najverjetneje še bistveno povečalo (Kgyugen, 2006).

V rod *Steinernema* tako uvrščamo naslednje vrste ogorčic: *Steinernema abbasi*, *S. aciari*, *S. affine*, *S. akhursti*, *S. anatoliense*, *S. anomali*, *S. apuliae*, *S. arenarium*, *S. asiaticum*, *S. beddingi*, *S. bibionis*, *S. bicornutum*, *S. carpocapsae*, *S. caudatum*, *S. ceratophorum*, *S. cubanum*, *S. diaprepesi*, *S. feltitae*, *S. glaseri*, *S. guangdongense*, *S. hermaphroditum*, *S. intermedium*, *S. jollieti*, *S. kariii*, *S. kraussei*, *S. kushidai*, *S. litorale*, *S. loci*, *S. longicaudum*, *S. monticolum*, *S. neocurtillae*, *S. oregonense*, *S. pakistanense*, *S. puertoricense*, *S. rarum*, *S. riobravis*, *S. ritteri*, *S. robustispiculum*, *S. sangi*, *S. scapterisci*, *S. scarabaei*, *S. siamkayai*, *S. silvaticum*, *S. tami*, *S. thanhi*, *S. thermophylum*, *S. yirgalomense*, *S. websteri*, *S. weiseri*. V rod *Neosteinernema* štejemo le vrsto *Neosteinernema longicurvicauda* (Kgyugen, 2006).

#### 2.2.3.1 *Steinernema carpocapsae* (Weiser)

Gre za entomopatogeno ogorčico, ki je ena izmed najbolj raziskanih, dostopnih in prilagodljivih vrst. Se enostavno razmnožuje in formulira skoraj v suhem stanju, v katerem se pri sobni temperaturi lahko ohrani več mesecev. Je zelo učinkovita pri parazitiranju gosenic iz družine Pyralidae ter ličink in bub iz družine Noctuidae (Peters, 1996a; Gaugler, 1999; Koppenhöfer, 2000). Za razliko od nekaterih drugih vrst, ki iščejo svoje žrtve aktivno, se *S. carpocapsae* postavi vzravnano na rep in tako počaka novega gostitelja. Najpogostejši vstop ogorčice v novega gostitelja je skozi dihalno in zadnjično odprtino. Svoje gostitelje najučinkoviteje parazitira pri temperaturi od 22 do 28°C (Gaugler, 1999). Odrasla ogorčica meri v dolžino 558 µm in v širino 25 µm, infektivna ličinka pa je dolga med 438 ter 650 µm in široka 20-30 µm (Gaugler, 2002).

#### 2.2.3.2 *Steinernema feltiae* (Filipjev)

Omenjena vrsta najpogosteje parazitira ličinke dvokrilcev (Diptera) (Peters, 1996a; Gaugler, 1999; Koppenhöfer, 2000). Svoje žrtve lahko učinkovito parazitira tudi pri nižji temperaturi, na primer pri 10°C. Izmed vseh vrst iz rodu *Steinernema* je *S. feltiae* najmanj stabilna, saj je njena življenjska doba v pripravkih zelo kratka (Gaugler, 1999). Odrasel osebek je dolg 849 µm in širok 26 µm, infektivna ličinka pa meri v dolžino med 736 ter 950 µm in v širino 22-29 µm (Gaugler, 2002).

### 2.3 DVOSPOLNIKI IN ENOSPOLNIKI

Za rod *Steinernema* je značilno, da se infektivne ličinke razvijejo v samce in samice, medtem ko se infektivne ličinke iz rodu *Heterorhabditis* razvijejo v samooplodne dvospolnike (hermafrodite) s fenotipom samice. Ta razlika je značilna le za prvi rod entomopatogenih ogorčic. Pri obeh predstavnikih se namreč v drugem rodu pojavijo tako samci kot samice, ki se med seboj pari in oblikujejo tretji rod ali pa infektivne ličinke, odvisno od zalog hrane. Dvospolniki iz rodu *Heterorhabditis* odložijo nekaj jajčec tudi zunaj telesa. Večina predstavnikov iz rodu *Heterorhabditis* se v drugem rodu izvali in

razvije v dvospolniku, na katerem se tudi hranijo, tako da ta pogine. Iz poginule ogorčice izstopijo infektivne ličinke, kar strokovno imenujemo »endokia matricida« (Burnell in Stock, 2000).

Kot zanimivost naj omenim, da so po parazitiranju voščene vešče (*Galleria mellonella* L.) z eno ogorčico vrste *Heterorhabditis bacteriophora* ugotovili 20-25 % samcev, 35-40 % samic in 35-40 % dvospolnikov. Tudi ob povečanju števila ogorčic v ličinkah voščene vešče je bilo razmerje med predstavniki treh skupin podobno. Če je bil gostitelj manjši je bil sicer opažen večji delež dvospolnikov (hermafroditov) (Gaugler, 2002; Koppenhöfer in Kaya, 2002).

### 2.3.1 Razlike med rodovima *Steinernema* in *Heterorhabditis*

S pomočjo molekulskih raziskav je bilo ugotovljeno, da ogorčice iz obeh rodov niso tesno povezane. Med rodovima *Heterorhabditis* in *Steinernema* je več razlik. Prva temelji na dejstvu, da so vsi predstavniki rodu *Heterorhabditis* v svojem prvem rodu dvospolniki, infektivne ličinke pa nosijo simbiotsko bakterijo v srednjem črevesu. Prvi rod predstavnikov iz rodu *Steinernema* predstavljajo samci in samice, infektivne ličinke pa imajo simbiotsko bakterijo v posebnem črevesnem mehurčku (veziklu).

Infektivne ličinke predstavnikov iz rodu *Heterorhabditis* imajo v bližini ust zobcu podoben izrastek, medtem ko ga tiste iz rodu *Steinernema* nimajo. Simbiotske bakterije infektivnih ličink iz rodu *Heterorhabditis* so iz rodu *Photorhabdus*, simbiotske bakterije infektivnih ličink iz rodu *Steinernema* pa spadajo v rod *Xenorhabdus*. Infektivne ličinke obeh rodov se lahko razvijejo v odrasle osebke (imago) tudi brez prisotnosti simbiotskih bakterij (Kaya in Koppenhöfer, 1999).

Samci prvega rodu entomopatogenih ogorčic iz rodu *Heterorhabditis* imajo burso in 9 parov spolnih bradavic, katerih število je lahko tudi manjše. Nasprotno pa samci prvega rodu predstavnikov iz rodu *Steinernema* burse sploh nimajo, imajo pa 10 ali 11 parov spolnih bradavic in eno ne parno spolno bradavico .

## 2.4 RAZVOJNI KROG ENTOMOPATOGENIH OGORČIC

Razvojni krog entomopatogenih ogorčic vključuje naslednje razvojne stadije: jajčece, ličinka, ki se navadno štirikrat levi in odrasel osebek (imago). Med razvojnimi stadiji ogorčic, ki živijo v tleh, so le infektivne ličinke sposobne povzročiti okužbo. Gre za ličinke tretjega larvalnega stadija (L3) prvega rodu entomopatogenih ogorčic. Takšne ličinke, so prosto živeče in dobro prilagojene na pomanjkanje hrane v daljšem časovnem obdobju. Energijo črpajo iz lastnih zalog. Infektivna ličinka nosi v sprednjem delu črevesa (v posebnih veziklih) od 200 do 2000 simbiotskih bakterij (Gaugler, 2002).

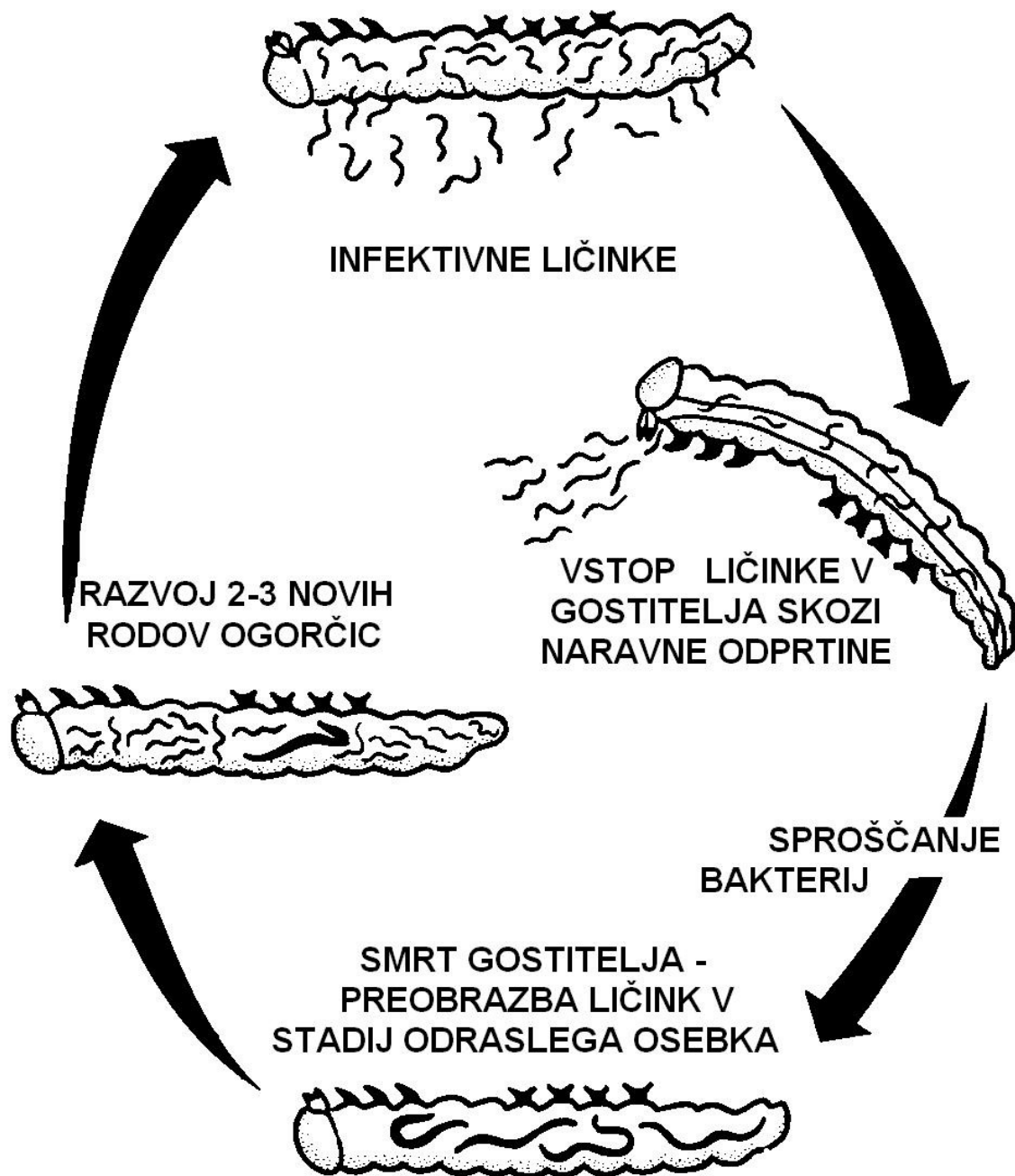
Infektivne ličinke entomopatogenih ogorčic vstopijo v gostitelja prek naravnih odprtín (dihalne odprtine, ustni aparat, zadnjična odprtina) oziroma prek kutikule. V hemolimfi gostitelja nato ogorčice sprostijo zanje značilne simbiotske bakterije. Bakterije se v hemolimfi hitro množijo in proizvajajo toksine ter druge sekundarne metabolite, ki prispevajo k oslabitvi obrambnega mehanizma gostitelja. V približno dveh dneh po vstopu infektivne ličinke v gostitelja le-ta pogine (Gaugler, 2002).

V gostitelju se torej prične dvojni razvojni krog, ogorčice in bakterije. Ogorčice prvega rodu preidejo v drugi rod. Po štirikratni levitvi ličink in obdobju imaga ogorčice preidejo v tretji rod, ki uspeva v gostitelju toliko časa, dokler ima na voljo hrano. Gostitelj je tedaj že mrtev, kajti toksini, ki jih je izločila bakterija ga pred tem že pokončajo (24 - 72 ur po vstopu ogorčice v gostitelja). To pomeni, da je tretji rod ogorčic že saprofitski (Gaugler, 2002).

Bakterije proizvajajo tudi takšne toksine, ki od razpadajočega trupla odganjajo ostale mikroorganizme, ki bi se želeli z njim prehranjevati. Gre za tipičen zgled simbiotsko mutualističnega odnosa med ogorčicami in bakterijami. Ogorčica namreč omogoča bakteriji vstop v gostitelja, bakterija pa v zameno za »taxi službo« ogorčici ubije gostitelja in ga razgradi na takšne snovi, ki jih nato entomopatogena ogorčica lahko uporabi za hrano. Ko je razvojni krog zaključen, ogorčica zapusti nerazgradljeni del trupla in se vrne v tla. Zunaj gostitelja lahko ogorčica v tleh živi le nekaj mesecev, nato pogine (Gaugler, 2002)

Najugodnejše razmere za razmnoževanje ogorčic so v hemolimfi gostitelja. V ugodnih razmerah infektivne ličinke iz rodu *Steinernema* zapustijo gostitelja 6. do 11. dan po parazitiranju, tiste iz rodu *Heterorhabditis* pa 12. do 14. dan po parazitiranju (Kaya, 2000). Ogorčice lahko razvijejo v enem gostitelju do tri rodove. Izjema je vrsta *Steinernema kushidai*, ki ima zaradi njene velikosti vedno le en rod (Kaya, 2000).

Nekatere novejšje raziskave kažejo, da lahko tudi ogorčica sama proizvaja toksine, s katerimi je sposobna ubiti gostitelja. To pomeni, da je bila prvotna hipoteza Glaserja, Foxa in Steinerja »ogorčica ubije gostitelja« pravilna.



Slika 1: Razvojni krog entomopatogenih ogorčic (Koppenhöfer in Kaya, 2002)



## 2.5 ODNOSI MED OGORČICAMI IN ŽUŽELKAMI

Odnose med ogorčicami in žuželkami lahko razvrstimo zelo različno; od tistih, kjer govorimo zgolj o naključnem odnosu, do tistega, pri katerem je smotno uporabiti izraz parazitski. Vse te odnose lahko ponazorimo z izrazom »entomofilne ogorčice«. O entomopatogenih ogorčicah govorimo šele takrat, ko imajo le-te z žuželkami fakultativen ali obligaten parazitski odnos. Pojav parazitizma entomopatogenih ogorčic na ciljni organizem se odraža kot sterilnost, zmanjšana plodnost, slabše letalne sposobnosti, krajša življenjska doba, zaostanek v razvoju, kot tudi druga, vedenjska, morfološka in psihološka odstopanja od osebkov, ki ni bil napaden (Kaya in Koppenhöfer, 1999).

V večini zgledov pa kompleks entomopatogenega ogorčica/gostitelj povzroči smrt slednjega. Parazitski odnos z žuželkami je znan za ogorčice iz 23 družin, med katerimi imajo ogorčice iz sedmih družin lastnosti, ki so potrebne za biotično zatiranje žuželk. Med slednje spadata tudi družini *Heterorhabditidae* in *Steinernematidae*. Obe družini odstopata od ostalih po visoki stopnji virulentnosti in lažjemu načinu gojenja, in prav zato sta najpomembnejši vir entomopatogenih ogorčic v biotičnem varstvu rastlin pred škodljivimi žuželkami.

Nekatere vrste ogorčic imajo obligaten parazitski odnos z žuželkami, kjer ni vidnih škodljivih vplivov na gostitelja. Spet druge vrste ogorčic imajo fakultativen oziroma obligaten parazitski odnos z vidnimi škodljivimi vplivi na gostitelja. Ko govorimo o fakultativnem parazitskem odnosu je potrebno dodati, da imajo ogorčice od popolnoma neodvisen razvojni krog, parazitski razvojni krog pa se pojavi šele tedaj, ko je gostitelj dostopen. V obligatnem parazitskem odnosu ogorčice ne morejo preživeti brez gostitelja (Kaya in Koppenhöfer, 1999).

Trenutno je znanih 63 vrst entomopatogenih ogorčic iz treh rodov, vendar imajo samo vrste iz rodov *Steinernema* in *Heterorhabditis* (Rhabditida) pomembno vlogo v biotičnem varstvu rastlin pred škodljivimi žuželkami (Koppenhöfer in Kaya, 2002). Vsako leto strokovnjaki odkrijejo nekaj novih vrst entomopatogenih ogorčic (Kaya, 2000). Ker gre v večini primerov še vedno zgolj za laboratorijske poskuse, kjer je kontakt med ogorčicami in gostitelji zagotovljen in kjer so okoljski pogoji najustreznejši, lahko večina entomopatogenih ogorčic parazitira številne vrste žuželk (Kaya in Koppenhöfer, 1999).

### 2.5.1 Načini parazitiranja

V razvojnem krogu entomopatogenih ogorčic imajo sposobnost parazitiranja samo t.i. infektivne ličinke. Vstop tega parazitskega stadija v gostitelja je mogoč prek dihalnih odprtih, ustne in zadnjične odprtine. Po uspešnem vstopu v dihalni ali prebavni sistem gostitelja, morajo infektivne ličinke predreti še steno traheol in steno prebavnega trakta. Cilj lahko dosežejo z uporabo fizične moči, in sicer z udarjanjem telesa ali zoba, ki je na koncu ust, kar je značilno za infektivne ličinke ogorčic iz rodu *Heterorhabditis*. Ker so stene traheol zelo nežne, jih lahko infektivne ličinke predrejo le s pritiskom glave. Večjo oviro pa predstavlja prediranje sten prebavnega sistema, saj je membrana močnejša. Entomopatogena ogorčica *Steinernema glaseri* potrebuje kar 4 do 6 ur, da predre steno srednjega črevesa hrošča *Popillia japonica*. Simbiotske bakterije se sprostijo od pol ure do petih ur po tem, ko infektivne ličinke predrejo steno (Kaya, 2000). Prav zaradi tega je vstop skozi dihalno odprtino najpogostejši način vstopa entomopatogenih ogorčic v gostitelja. Kot zanimivost naj omenim, da so entomopatogene ogorčice sposobne parazitiranja ličinke vrst *Tipula paludosa* ter *Tipula oleracea* le neposredno prek povrhnjice in le redko preko ustne ter zadnjične odprtine (Peters in Ehlers, 1994).

### 2.5.2 Obrambni odgovor žuželk na parazitiranje entomopatogenih ogorčic

Nekaterih vrst žuželk infektivne ličinke ne morejo parazitirati, predvsem zaradi tega, ker so najpogostejša vhodna mesta v gostitelja za njih neprehodna. Ozke telesne odprtine takšnih gostiteljev včasih ovirajo ali onemogočajo vstop infektivnim ličinkam. Spet pri drugih vrstah žuželk pa so lahko takšne poti nedostopne. Tako so na primer usta žuželk lahko zaprta z ustnim filtrom ali pa so preozka, kar je značilno predvsem za žuželke s sesajočim ustnim aparatom in kot tudi za majhne žuželke z ustnim aparatom za grizenje. Obrambni odgovor nekaterih žuželk (Diptera in Lepidoptera) pa temelji na odkritju, da lahko zadnjično odprtino zapira mišica, dihalna odprtina pa je lahko prekrita z dlačicami ali je preozka za vstop ogorčic (Koppenhöfer, 2000).

Nekatere talne žuželke so razvile prav posebne vedenjske oblike, ki zmanjšujejo možnost, da bi jih parazitirale infektivne ličinke entomopatogenih ogorčic. To dosežejo s pogostim odvajanjem blata (ličinke družine Scarabaeidae), kar zmanjšuje možnost vstopa ogorčic prek zadnjične odprtine, z manjšim proizvajanjem in izločanjem CO<sub>2</sub> (bube reda Lepidoptera in ličinke družine Scarabaeidae), s tvorbo neprepustnega zapredka še pred zapredanjem (Scarabaeidae in Lepidoptera), z razgraditvijo parazitiranih osebkov za preprečitev kontaminacije (termiti) ali z agresivnim, napadalnim obnašanjem (ličinke družine Scarabaeidae). Nekatere žuželke lahko z ustnim aparatom stisnejo (usmrtiljo) infektivne ličinke (Koppenhöfer, 2000).

Nekatere žuželke uporabijo obrambne mehanizme šele pozneje, ko ogorčica že vstopi v njihovo telo. Okrog entomopatogene ogorčice začnejo tvoriti obroč iz melanina, ki ogorčico osami še preden le-ta sprostí simbiotske bakterije v hemolimfi gostitelja. Tako izolirana ogorčica propade, žuželka pa jo nato izloči iz telesa. Kot protiobrambo temu mehanizmu, so ogorčice razvile »obrambni mehanizem«, s katerim odvržejo svojo kutikulo in tako je gostitelj ne prepozna kot škodljivca.

Žuželke so kot posamezniki zelo dovzetne za parazitiranje ogorčic, medtem ko se žuželke, združene v kolonije, lahko zelo učinkovito branijo pred njimi. Pri tem izolirajo oziroma odstranijo parazitirane žuželke ali pa se celotna kolonija preseli na drugo mesto (Koppenhöfer, 2000).

## 2.6 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA PREŽIVETJE ENTOMOPATOGENIH OGORČIC

### 2.6.1 Biotični in abiotični dejavniki

Dejavniki, ki vplivajo na preživetje entomopatogenih ogorčic so notranji, kot na primer genetski, fiziološki in vedenjski, ter zunanji, ki jih delimo na abiotične in biotične. Abiotični dejavniki so temperatura, vlaga, tekstura tal, ultravijolična svetloba in fitofarmaceutvska sredstva. Biotični dejavniki, ki so ugodni za ogorčice, ustvarjajo ustrezno okolje za življenje entomopatogenih ogorčic. Mednje sodita prisotnost njihovih gostiteljev in rastlin. Biotični dejavniki lahko na ogorčice delujejo tudi antagonistično (Gaugler, 2002).

Ogorčice lahko preživijo neugodne okoljske razmere v dormantnem stanju. V stanju dormance so lahko organizmi v diapavzi ali mirovanju. O stanju mirovanja govorimo takrat, ko se razvoj organizma ustavi. Razvoj se ne nadaljuje toliko časa, dokler niso izpolnjene določene zahteve, tudi če se spet vzpostavijo ugodne okoljske razmere. Mirovanje je neobvezen odgovor na neugodne okoljske razmere. V stanju dormance se metabolizem upočasni in se lahko, potem ko se vzpostavijo ugodne okoljske razmere, ponovno vrne v prvotno stanje. Neugodne okoljske razmere za delovanje entomopatogenih ogorčic predstavljajo pomanjkanje vode, ekstremne temperature, pomanjkanje kisika in osmotski stres. Vsak od teh dejavnikov vpliva na preživetje ogorčic (Gaugler, 2002). Večina entomopatogenih ogorčic lahko le v stadiju infektivnih ličink preide v stanje dormance zunaj gostitelja.

Infektivne ličinke imajo dve plasti zunanje povrhnjice. Povrhnjica se strukturno razlikuje med različnimi vrstami entomopatogenih ogorčic in ima pomembno vlogo pri zadrževanju vode v telesu, s čimer preprečuje izsušitev. Infektivne ličinke imajo med dormanco zaprto ustno in zadnjično odprtino in s tem preprečujejo vstop mikrobnim škodljivim organizmom in škodljivim kemikalijam. V tem obdobju se ne prehranjujejo in je njihovo preživetje

odvisno od notranjih virov energije (zalog). Preživetje infektivnih ličink je torej odvisno od njihovega metabolizma in začetne ravni energijskih rezerv. Energijske rezerve so potrebne za podporo fiziološkimi in vedenjskim procesom, ki spremljajo prilagajanje na okoljski stres (Gaugler, 2002).

Nekatere entomopatogene ogorčice so sposobne preživeti tudi v razmerah, kjer se okoljska temperatura spusti pod ledišče. Preživetje v tako hladnih razmerah jim omogoča njihova odpornost na mraz. Organizmi, odporni na mraz, preživijo tvorbo ledu v telesni votlini in v zunajceličnih prostorih. Intracelularna zmrznitev je najpogosteje smrtna. Organizmi, dovzetni na mraz, pa imajo sposobnost, da telesne tekočine ohranijo v tekočem stanju tudi takrat, ko temperature padejo pod ledišče (Gaugler, 2002). Dokazano je, da so ogorčice vrst *Steinernema feltiae*, *Steinernema anomali* in *Heterorhabditis bacteriophora* odporne na mraz in lahko preživijo tudi pri temperaturah  $-22^{\circ}\text{C}$ ,  $-14^{\circ}\text{C}$  oziroma  $-19^{\circ}\text{C}$ . Nekatere ogorčice lahko preživijo tudi pri temperaturah nižjih od  $-80^{\circ}\text{C}$ , kjer se metabolizem skoraj ustavi. Raziskave so pokazale, da bi entomopatogene ogorčice lahko shranjevali tudi v tekočem dušiku (Gaugler, 2002).

Vpliv temperature na entomopatogene ogorčice je odvisen od vrste ogorčic. Na splošno postanejo infektivne ličinke počasne pri temperaturah nižjih od  $10$  do  $15^{\circ}\text{C}$  in neaktivne pri temperaturah višjih od  $30$  do  $40^{\circ}\text{C}$ . Večina infektivnih ličink najučinkoviteje parazitira žuželke pri temperaturah med  $20$  in  $30^{\circ}\text{C}$ . Izjemi sta vrsti *Steinernema feltiae*, ki je najučinkovitejša v temperaturnem intervalu med  $12$  in  $25^{\circ}\text{C}$  ter *Steinernema riobrave*, za katero velja enako v temperaturnem intervalu med  $25$  in  $35^{\circ}\text{C}$  (Koppenhöfer, 2000). Višje temperature povzročijo višjo metabolno aktivnost in porabo energijskih rezerv ter zato vplivajo na krajšo življenjsko dobo ogorčic (Koppenhöfer in Kaya, 2002). Temperature, višje od  $32^{\circ}\text{C}$ , imajo negativen vpliv na razmnoževanje, rast in preživetje različnih organizmov, tudi ogorčic.

Entomopatogene ogorčice so zelo občutljive na sončno svetlobo, predvsem na ultravijolične žarke. Z različnimi poskusi je bilo dokazano, da je ogorčica *Heterorhabditis bacteriophora*, ki je bila 4 minute izpostavljena ultravijoličnemu sevanju z valovno dolžino  $302\text{ nm}$ , znatno izgubila sposobnost parazitiranja. Enako je bilo ugotovljeno tudi za vrsto *Steinernema carpocapsae*, če je bila takšnemu sevanju izpostavljena 6 minut (Smith, 1999). ultravijolična svetloba lahko povzroči smrt ogorčic v nekaj minutah (Koppenhöfer, 2000).

Entomopatogene ogorčice so občutljive tudi na pomanjkanje vlage, kar zelo omejuje njihovo uporabo v biotičnem varstvu rastlin. Ogorčice potrebujejo vodni film okoli njihovega telesa. Sušne razmere zmanjšujejo možnost njihovega premikanja in preživetja (O'Leary s sod., 2001). Nekatere ogorčice oblikujejo tanko plast povrhnjice, kadar so izpostavljene sušnim razmeram. S tem zmanjšajo izgubo vode zaradi manjše površine kutikule, ki je izpostavljena izsuševanju. Ugotovljeno je bilo, da so entomopatogene ogorčice iz rodov *Steinernema* in *Heterorhabditis* sposobne preživeti v suhih tleh od 2 do 3

tedne, medtem, ko na talnem površju preživijo le nekaj ur po nanosu, odvisno od vrste ogorčic, temperature in relativne zračne vlage (Gaugler, 2002).

Ogorčice lahko prenašajo velike spremembe koncentracije soli v okolju. Težavo pri tem lahko povzroča vdor vode v telo zaradi osmoze. Nekatere vrste ogorčic imajo posebne mehanizme za odstranjevanje odvečne vode. Ti mehanizmi temeljijo na principu uravnavanja permeabilnosti kutikule, aktivnosti črevesja ali izločanja soli in tako zmanjšujejo osmotski gradient. Dokazano je, da infektivne ličinke vrste *Steinernema carpocapsae* dehidrirane zaradi osmoze ali izsušitve, enako dobro prenašajo vročinski stres. Ni pa jasnih dokazov, da dehidriranost zaradi osmoze vzpodbudi stanje mirovanja (dormanco), podobno kot pri počasnem izsuševanju (Gaugler, 2002).

Ker so ogorčice aerobni organizmi, zmanjšanje dostopnost kisika v tleh vpliva na njihovo preživetje. Kisik je omejujoč dejavnik v glinastih, mokrih tleh in v tleh z visoko vsebnostjo organske snovi. Infektivne ličinke vrste *Steinernema carpocapsae* postanejo popolnoma neaktivne, če so 16 ur izpostavljene anaerobnim razmeram (brez kisika). V anaerobnih razmerah so infektivne ličinke odvisne od njihovih zalog ogljikovih hidratov, ki jih porabijo za proizvodnjo energije. Čas, ki ga infektivne ličinke preživijo v anaerobnih pogojih, je v veliki meri povezan s temperaturo okolja (Gaugler, 2002).

Ogorčice iz družin Steinernematidae in Heterorhabditidae lahko preživijo tudi če so izpostavljene nekaterim fitofarmaceutskim sredstvom. Vendar pa so infektivne ličinke občutljive na več nematicidov, ki se uporabljajo v kmetijstvu. Nekatera fitofarmaceutska sredstva je priporočljivo uporabiti šele od enega do dveh tednov po aplikaciji ogorčic (Smith, 1999).

Znotraj vrstno in medvrstno tekmovanje ogorčic se lahko kaže v zmanjšani življenjski moči ogorčic oziroma vodi v beg ogorčic. Za znotraj vrstno tekmovanje je značilno, da več infektivnih ličink parazitira enega gostitelja, pri čemer lahko ogorčice medsebojno tekmovanje fizično oslabi. Čeprav se lahko več vrst ogorčic iz rodu *Steinernema* razvija v enem gostitelju, pa že prisotnost ene dodatne vrste zmanjša življenjsko moč drugih vrst, kar se kaže v manjši reprodukciji. Ugotovljeno je bilo, da lahko to vpliva tudi na lokalno iztrebljanje določenih vrst entomopatogenih ogorčic (Koppenhöfer in Kaya, 2002).

## **2.6.2 Naravni sovražniki entomopatogenih ogorčic**

Naravni sovražniki imajo velik pomen pri zmanjševanju števila entomopatogenih ogorčic v tleh. Na populacijsko rast ogorčic v tleh tako vplivajo bakterije, glive, pršice, predatorske ogorčice in ostali talni organizmi. Najbolj uspešni naravni sovražniki med naštetimi so nedvomno pršice. Zlasti v tretjem stadiju ogorčic prvega rodu (L3), ko so le-te v tleh kot dormantne ličinke, so za predatorje in parazite še posebno zanimive (Gaugler, 2002).

V nekaterih poskusih v tleh se je tudi bakterija *Bacillus thuringensis* izkazala kot zelo učinkovit antagonist entomopatogenih ogorčic. V tleh se nahajajo tudi nekatere bakterije, ki so sposobne parazitiranja simbiotskih bakterij (bakteriofag), s čimer posledično vplivajo na slabšo aktivnost ogorčic.

Strokovnjaki so v zadnjem obdobju raziskav entomopatogenih ogorčic odkrili še vrsto drugih naravnih sovražnikov, med katere sodijo tudi praživali (Protozoa). Posebno zanimive so tudi nematofagne glive, ki s hifami prodrejo v entomopatogene ogorčice in jih na ta način ubijejo.

## 2.7 GIBANJE ENTOMOPATOGENIH OGORČIC

Entomopatogene ogorčice se v tleh premikajo vertikalno in horizontalno. Po prostoru se razporejajo zelo neenakomerno, odvisno od vrste ogorčic. Na splošno se ogorčice vrste *Heterorhabditis bacteriophora* enakomerneje razporedijo po prostoru kot tiste iz vrst *Steinernema carpocapsae* ali *Steinernema feltiae*. Ogorčice vrste *Steinernema carpocapsae* se zadržujejo v globini od enega do dveh centimetrov, vrsta *Heterorhabditis bacteriophora* pa v globini osmih centimetrov. Omenjeni vrsti med seboj ne tekmujeta za gostitelje (Komionek s sod., 1997). Ogorčice se lahko v dveh tednih premaknejo tudi do 50 cm, in sicer v tleh, ki vsebujejo 40 % peska, 33 % blata in 26 % gline (Kamionek in sod., 1997).

Infektivne ličinke se po prostoru gibljejo horizontalno in vertikalno, in sicer tako aktivno kot pasivno. Pasivno se premikajo z dežjem, vetrom, zemljo, živalmi ali ljudmi. Aktivno premikanje ogorčic merimo v centimetrih, pasivno pa v kilometrih (Smart, 1995). Infektivne ličinke iščejo gostitelja aktivno ali na mestu, lahko pa tudi na kombiniran način obeh.

Za infektivne ličinke je značilno nihanje telesa, kjer je 30-95 % telesa za nekaj sekund dvignjeno nad podlago. Nekatere ogorčice lahko dvignejo tudi več kot 95 % telesa, tako da se postavijo na rep. Ko stojijo na repu so vzravnane in mirne ali pa se izmenično nihajo naprej in nazaj (Kaya, 2000). Ogorčice, ki gostitelja čakajo na mestu, nihajo več kot 70 % iskalnega časa, z dvigom skoraj celega telesa nad podlago pa lahko napadejo bližnjega gostitelja. Entomopatogene ogorčice s kombiniranim načinom iskanja gostiteljev nihajo manj pogosto in tudi krajši čas, kot na primer vrsta *Steinernema riobrave* ali pa sploh ne nihajo, kot na primer ogorčica *Steinernema feltiae*. Za entomopatogene ogorčice, ki svojega gostitelja iščejo aktivno, nihanje ni značilno (Gaugler, 2002).

Infektivne ličinke, ki nihajo, lahko tudi skačejo. Skakanje je lahko neposredno, to je na gostitelja ali posredno, zaradi premikanja (Kaya, 2000). Vrsta *Steinernema carpocapsae* meri v dolžino 0,56 mm in lahko skoči do 4,8 mm v dolžino in 3,9 mm v višino. Ugotovljeno je bilo, da vrsti *Steinernema carpocapsae* in *Steinernema scapterisci* skačeta proti vonju gostitelja, kar dokazuje, da je skakanje povezano z iskanjem gostitelja infektivnih ličink (Grewal, 1999b).

## 2.8 PROIZVODNJA ENTOMOPATOGENIH OGORČIC

Entomopatogene ogorčice lahko gojimo »*in vivo*« in »*in vitro*« (Ehlers, 2001). »*In vivo*« gojenje ogorčic poteka s pomočjo žuželk, njihovih gostiteljev. Gojenje na tak način je zelo zanesljivo in poceni (Grewal, 1999b). Navadno so gostitelji ličinke voščene vešče (*Galleria mellonella*). Voščena vešča je namreč znana kot vrsta, ki je zelo ustrezna za gojenje različnih vrst ogorčic. Pridelek na eno ličinko voščene vešče je od  $3,5 \times 10^5$  do  $4 \times 10^5$  infektivnih ličink (Grewal, 1999b). Za tretiranje enega hektara z  $2,5 \times 10^5$  infektivnimi ličinkami tako potrebujemo 25 ličink voščene vešče. »Pridelek« ogorčic na način »*in vivo*« je lahko manjši predvsem zaradi možnosti okužb z virusi (Grewal, 1999b).

»*In vitro*« gojenje ogorčic poteka na trdnem ali tekočem gojišču. Trdno gojišče je že leta 1931 odkril eden od pionirjev uporabe entomopatogenih ogorčic, v biotičnem zatiranju škodljivih žuželk, Rudolf Glaser. Takrat še niso poznali simbiotskih bakterij. Ogorčice so gojili na gojišču iz tankih rezin telečjega mesa, z dodatkom salicilne kisline in formaldehida za preprečitev okužbe z mikrobi. Leta 1981 je Bedding razvil gojišče, ki je bilo kot prvo uspešno uporabljeno za komercialno proizvodnjo ogorčic. S to metodo so ogorčice gojili na gojišču, sestavljenem iz zdrobljene poliuretanske gobe, prepojene z emulzijo goveje maščobe in prašičjih ledvic. Na en gram trdega gojišča so pridelali od  $6 \times 10^5$  do  $10 \times 10^5$  infektivnih ličink (Grewal, 1999b).

Leta 1990 je Friedman poročal o tekoči fermentacijski metodi za proizvodnjo velikega števila infektivnih ličink. Za proizvodnjo entomopatogenih ogorčic vrste *Steinernema carpocapsae* je predlagal uporabo tekočega gojišča, sestavljenega iz sojine moke, kvasa, koruznega olja in rumenjaka. Pridelek je bil  $1,1 \times 10^5$  infektivnih ličink na ml tekočega gojišča. Danes večinoma proizvajajo entomopatogene ogorčice na tekočem gojišču, saj je takšna proizvodnja zelo poceni, pridelek pa je visok. Sestava tekočega gojišča je varovana skrivnost vsakega proizvajalca. Gojenje entomopatogenih ogorčic iz rodu *Heterorhabditis* je v tekočem gojišču nestabilno (Shapiro in Gaugler, 2002).

### 2.8.1 Formulacija entomopatogenih ogorčic

Formulacija entomopatogenih ogorčic se nanaša na pripravo sredstva, ki je sestavljeno iz aktivne snovi, to je entomopatogenih ogorčic, in dodatkov. Sredstvo je namenjeno izboljšanju učinkovitosti, učinkovitejšem transportu, enostavnejši uporabi in nespremenljivosti aktivne snovi med shranjevanjem. Med dejavnike, ki omejujejo možnosti izbire formulacijskih oblik in sestavin, štejemo veliko vsebnost kisika in vlažnost, občutljivost na ekstremne temperature in obnašanje infektivnih ličink (Grewal, 1998).

Škodljive dejavnike okolja, ki omejujejo možnost izbire formulacijskih oblik, je mogoče omejiti z nekaterimi dodatki k formulaciji. Ker so škodljivi dejavniki okolja največji pri foliarni aplikaciji, so takšni dodatki v glavnem namenjeni ogorčicam, ki zatirajo nadzemske škodljivce rastlin. Broadbent in Olthop (1995) priporočata dodatek glicerina za preprečitev izsuševanja, Bauer (1997) pa dodatek olja Roadspray. Največkrat so lahko dodatki fitotoksični ali negativno vplivajo na infektivne ličinke oziroma služijo kot substrat za rast gliv ali bakterij. Vsak dodatek mora biti zato preverjen na različnih vrstah rastlin in škodljivcev. Schroeder in Sieber (1997) poročata, da sredstvo za pomivanje posode poveča hitrost prehajanja ogorčic v tla (Koppenhöfer, 2000).

### 2.8.2 Formulacija za shranjevanje in transport

Infektivne ličinke so lahko shranjene v vodni suspenziji pri nizki temperaturi tudi več mesecev. Vendar pa takšen način shranjevanja in transporta ovirajo veliki stroški in težave pri ohranjanju kakovosti ogorčic. Velike potrebe po kisiku, občutljivost nekaterih vrst entomopatogenih ogorčic na nizke temperature in okužbe z mikrobi, so omejujoči dejavniki, ki vplivajo na kakovost ogorčic, shranjenih v vodni suspenziji. Zaradi tega so ogorčice navadno formulirane v netekočih ali delno tekočih medijih (Grewal, 2000a).

V vodni suspenziji so infektivne ličinke lahko shranjene pri temperaturi od 4 do 15°C, odvisno od vrste ogorčic, in sicer za obdobje od 6 do 12 mesecev za ogorčice iz rodu *Steinernema*, in od 3 do 6 mesecev za ogorčice iz rodu *Heterorhabditis*. Življenjska doba ogorčic je pri višji temperaturi krajša (Gaugler, 2000).

Danes je na trgu že veliko formulacij z ogorčicami, ki temeljijo na vlažni podlagi, kot je na primer goba in vermakulit (Grewal, 1998). Takšne formulacije morajo biti shranjene pri nižji temperaturi, da ostanejo ogorčice dlje vitalne. Za podaljšanje življenjske dobe ogorčic in povečanje odpornosti na ekstremne temperature so bile razvite formulacije, ki vplivajo na manjši metabolizem infektivnih ličink. To je mogoče doseči z zmanjšanjem aktivnosti infektivnih ličink ali z njihovim delnim izsuševanjem (Grewal, 2000b).



Trenutno je najobetavnejša formulacija entomopatogenih ogorčic tista z vodotopnimi granulami, ki združuje dolgo obstojnost ogorčic brez hlajenja (6 mesecev od 4 do 25°C oziroma 2 meseca pri 30°C) in enostavno uporabo. Delno izsušene infektivne ličike je potrebno po aplikaciji dobro navlažiti. Uporaba formulacij z delno izsušenimi infektivnimi ličinkami je za foliarno aplikacijo nepraktična (Koppenhöfer in Kaya, 2002).

Ogorčice, formulirane v obliki okuženih ličink voščene vešče so bolj učinkovite pri zatiranju rastlinskih škodljivcev kot ogorčice v vodni suspenziji (Gaugler, 2002). Formulacija entomopatogenih ogorčic v obliki vab je sestavljena iz infektivnih ličink, inertnega nosilca (koruzni zдроб, arašidov strok ali pšenični otrobi) in spodbujevalca hranjenja (glukoza, melasa) ali feromonov. Tak tip formulacije je posebno učinkovit za entomopatogene ogorčice vrst *Steinernema carpocapsae* in *Steinernema scapterisci*, saj ti vrsti njihove gostitelje čakata v »zasedi« in zato ne zapuščata formulacije. Formulacija, ki ogorčicam zagotavlja stik s ciljnim škodljivcem, se je v nekaterih primerih izkazala za bolj učinkovito od kemijskih pripravkov (Gaugler, 2002).

Za nanos ogorčic lahko uporabljamo opremo, ki je namenjena škropljenju s fitofarmaceutskimi sredstvi, gnojenju ali namakanju. V ta namen se uporabljajo ročne, nahrbtne in traktorske škropilnice, pršilniki in tudi letala. Infektivne ličinke lahko prehajajo prek škropilnih cevi, katerih premer znaša vsaj 100 µm. Prenesejo pritisk do 1086 kPa.

Žuželke, ki delajo izvrtine v rastlinah, lahko zatremo tudi z neposrednim vbrizgavanjem suspenzije entomopatogenih ogorčic v izvrtine ali pa odprtine izvrtin zapremo z gobo, ki je prepojena z infektivnimi ličinkami (Koppenhöfer, 2002).

Entomopatogene ogorčice je priporočljivo nanašati v zgodnjih jutranjih ali poznih večernih urah oziroma v oblačnem vremenu, ko ni nevarnosti za njihovo izsušitev, negativnega vpliva ultravijoličnega sevanja ali ekstremnih temperatur (Koppenhöfer in Kaya, 2002). Entomopatogene ogorčice večinoma uporabljamo za kurativno zatiranje, včasih pa tudi za preventivno zatiranje okoli sadik in semena. Standardna koncentracija nanosa je ena milijarda ogorčic na 0,5 ha zemljišča oziroma 20000 ogorčic na lonček s premerom 30 cm (Lewis, 2000).

## 2.9 ENTOMOPATOGENE OGORČICE IN GENETIKA

Metode klasične genetike in genskega inženiringa je mogoče uporabiti v genetskih raziskavah, z namenom »izboljšave« entomopatogenih ogorčic in njihovih simbiotskih bakterij (Gaugler, 1989). Mnogo zapletenih vedenjsko in fiziološko značilnih lastnosti, ki so tarča genskega inženiringa je največkrat kontroliranih poligeno (več genov vpliva na določeno lastnost), tako da je metoda selektivnega križanja za izboljšanje le-teh najbolj primerna (Gaugler, 1989). Še mnogo raziskav pa bo potrebnih, da bodo znanstveniki lahko spreminjali gene entomopatogenih ogorčic in njihovih simbiotskih bakterij. Še vedno je namreč na voljo premalo osnovnih podatkov o genskih in biokemičnih lastnostih, ki bi jih

bilo mogoče spremeniti z transgenimi metodami v omenjenih ogorčicah in njihovih bakterijah. Pri tem pa bi morali biti bolj dostopni obstoječi zapiski iz področja genskega spreminjanja.

Poglavitne prednosti bioinsekticidov v primerjavi z konvencionalnimi kemičnimi sredstvi so bile doslej dobro preučene (Gaugler in Kaya, 1990; Bedding in sod., 1993). Bioinsekticidi, ki temeljijo na entomopatogenih ogorčicah in njihovih simbiotskih bakterijah, se trenutno uporabljajo na majhnem tržišču (ZDA, nekatere Evropske države). Da bi povečali trg z entomopatogenimi ogorčicami, bo potrebno izboljšati lastnosti nekaterih vrst, ki so primerne za uporabo v biotičnem zatiranju škodljivih žuželk. Izboljšanje vrst glede na stopnjo patogenosti, števila možnih gostiteljev, prilagodljivosti na okoljske dejavnike in njihovo življenjsko dobo v biopripravkih trgovskih, so trenutno najbolj zaželene lastnosti, ki bi jih lahko pridobili z genskim inženiringom (Gaugler, 2002).

V zadnjih 25 letih je bilo največ raziskav z entomopatogenimi ogorčicami in njihovimi simbiotskimi bakterijami vezanih na njihovo bionomijo (način življenja in razvoja). Mnogo novih vrst iz rodov *Steinernema* in *Heterorhabditis* je bilo najdenih na različnih območjih sveta in za tem testiranih glede na stopnjo patogenosti na različne ciljne organizme kot tudi na odpornost na okoljske dejavnike. Napredek je bil dosežen v razumevanju njihovega življenjskega kroga, taksonomije, sistematike simbiotskih bakterij iz rodov *Photorhabdus* in *Xenorhabdus*, pridobeno pa je bilo tudi novo znanje iz področja bakterijske variabilnosti, simbiotsko mutualističnega kompleksa ogorčica-bakterija in o interakcijah med bakterijami in imunskim sistemom gostitelja. Poleg metod za »*in vitro*«  
proizvajanje entomopatogenih ogorčic in njihovih simbiotskih bakterij na pol tekočem mediju (agarju), so bili doslej preučeni tudi drugi načini njihove uporabnosti, kot naprimer njihove formulacije, shranjevanje in aplikativna uporabnost na prostem (Gaugler, 2002)

Izboljšano znanje biologije entomopatogenih ogorčic in njihovih simbiotov je pripeljalo raziskovalce do spoznanja, da ima genski inženiring teh organizmov velik potencial pri njihovi učinkovitejši rabi. Do danes so genetske študije na rodovih *Heterorhabditis* in *Steinernema* potekale z osnovnimi tehnikami, kot so selektivno križanje, genetsko spreminjanje posameznih vrst in mutageneza. Molekulski pristop je bil bolj obsežen pri preučevanju simbiotskih bakterij. Mnogo genov iz obeh rodov bakterij (*Photorhabdus* in *Xenorhabdus*) je bilo kloniranih, markiranih, njihova DNK je bila prenesena (na nizki stopnji učinkovitosti) v oba rodova ogorčic s pomočjo transformacije, konjugacije in transdukcije, kot tudi z uporabo plazmidov bakterije *Escherichia coli*.

## 2.9.1 Metode genskih izboljšav

### 2.9.1.1 Selektivno križanje

Mnoge koristne lastnosti domačih živali in ratlin se deduje poligeno (več genov vpliva na eno lastnost) in učinkovitost selektivnega križanja v genskih izboljšavah takšnih lastnosti je bila doslej dobro preučena. Ameriški nematolog Glazer je odkril, da so pri vrsti *Heterorhabditis bacteriophora* vrednosti dedovanja za ultravijolično sevanje in toplotno odpornost visoke, kar nakazuje, da bi bila umetna selekcija ustrezna metoda za genski inženiring. Metode selektivnega križanja so uspešne tudi pri rodu *Steinernema*, in sicer pri lastnosti iskanja gostitelja in izboljšanja patogenosti. Griffin in Downes (1994) poročata o uspešni selekciji rodu *Heterorhabditis* za izboljšanje infektivnosti pri nizkih temperaturah (Gaugler, 2002).

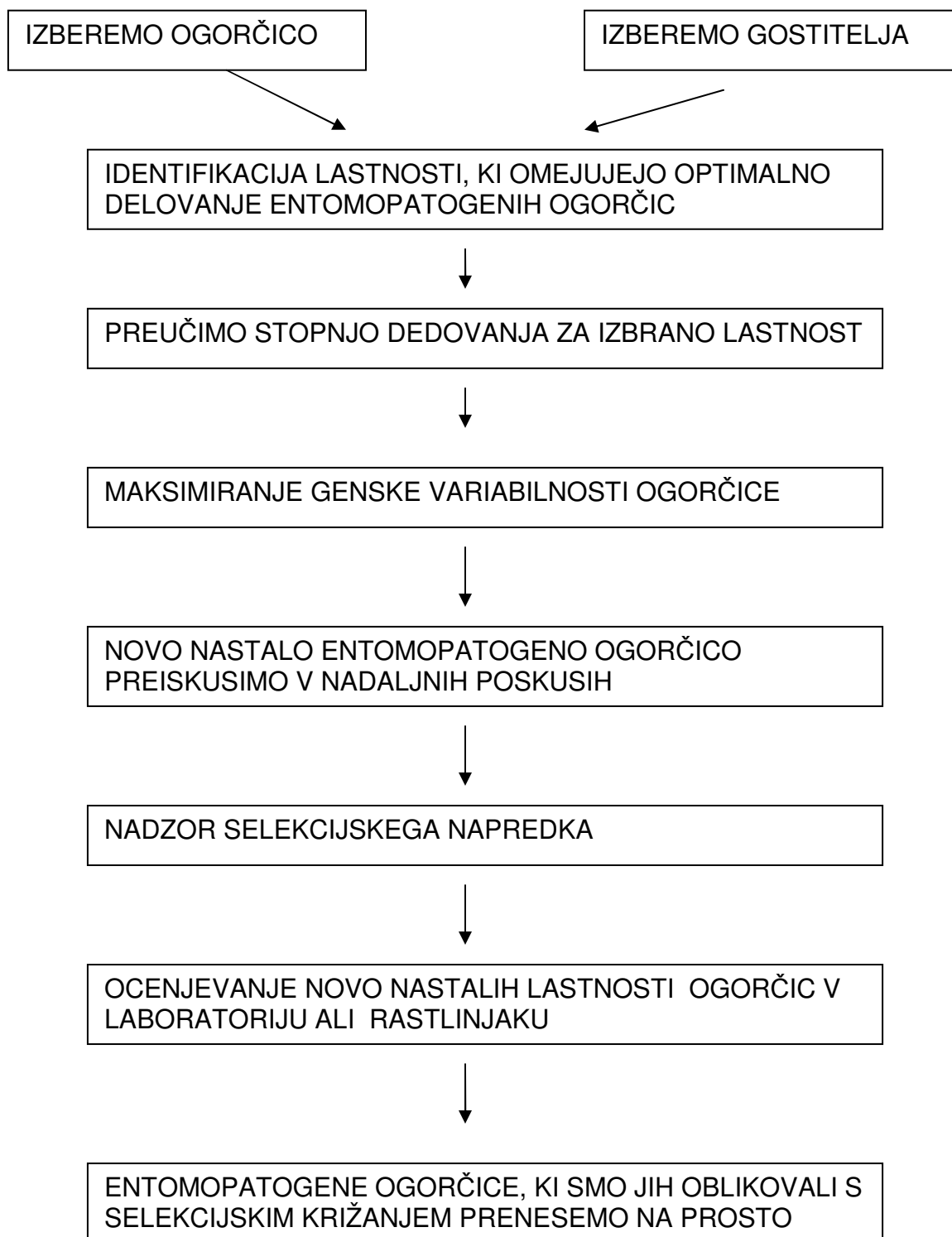
Leta 1995 sta Grewal in Gaugler uporabila umetno selekcijo za povečanje zgornje in spodnje temperaturne meje za infekcijo in jo potrdila v *H. bacteriophora* in *Steinernema anomali*. Uspešne laboratorijske selekcije pa ne vodijo vedno k izboljšanemu izražanju pridobljenih lastnosti na prostem, zaradi česar je potrebno posebno pozornost nameniti izbiri le določenih lastnosti za selekcijo in oblikovati biotip, s katerim bo mogoče meriti izbrane značilnosti selekcije na prostem. Delo Hastingsa in Westermana (1994) je odprlo novo pot v oblikovanju umetnega biotipa entomopatogenih ogorčic. Končni cilj selektivnega križanja entomopatogenih ogorčic je bil zaradi njihovega kratkega življenjskega kroga v nekaterih programih dosežen že v dveh letih. Zato bo selektivno križanje še naprej ostalo pglavitna sestavina programov genskega inženiringa entomopatogenih ogorčic v prihodnosti.

Doslej še ni bila preučena umetna selekcija za izboljšanje lastnosti simbiotskih bakterij iz rodov *Photorhabdus* in *Xenorhabdus*. Prva, ki sta skušala podrobneje raziskati oba rodova bakterij sta bila Clark in Dowds (1994), ki sta bila neuspešna pri izboljšanju nizko temperaturne vitalnosti obeh rodov pri dolgotrajni selekciji pri 9°C.

Pri selektivnem križanju izberemo kandidata (ogorčico) in nek ciljni organizem, na katerega entomopatogena ogorčica »deluje«. Sledi identifikacija lastnosti, ki omejujejo optimalno delovanje ogorčic v tem kompleksu (ogorčica-bakterija/izbran škodljivec). Nato je potrebno preučiti stopnjo dedovanja za izbrane lastnosti (lahko tudi zgolj za eno lastnost). Sledi maksimiranje genske variabilnosti ogorčic, pri čemer ustvarimo ogorčico z izbrano lastnostjo, ki jo tudi ohranjamo. Novo nastale ogorčice preiskujemo v nadaljnjih poskusih, da spoznamo njihove dolgoročne sposobnosti. Sledi nadzor selekcijskega napredka, ki pripelje do ocenjevanja novo nastalih lastnosti (v laboratoriju kot tudi v rastlinjakih). Če se te izkažejo za učinkovite, jih nato lahko postopoma prenesemo na prosto, kjer z večjim virulentnim učinkom delujejo na izbranega škodljivca. Opisan sistem omogoča raziskovalcem, da ocenijo kako stopnja dedovanja napoveduje selekcijski odgovor spremenjenih lastnosti (slika 2).

Številni programi selektivnega križanja, z namenom izboljšanja stopnje patogenosti kot tudi iskanja morebitnega gostitelja, so bili v preteklih letih dobro preučeni (Gaugler in sod., 1989; Grewal in sod., 1993; Peters in Ehlers, 1998). Rezultati, ki so jih raziskovalci pridobili v laboratorijih največkrat niso bili primerljivi z delovanjem ogorčic na prostem. Kot zgled naj navedem poskus Gauglerja in Campbella (1991), ki sta v laboratorijskem poskusu z ogorčico *Steinernema carpocapsae* dosegla za 72 % izboljšano sposobnost iskanja gostiteljev, vendar pa je bil nadaljnji poljski poskus s to vrsto neuspešen. Infektivne ličinke, ki sta jih uporabljala v laboratoriju, so se namreč iskale gostitelje glede na koncentracijo izločenega ogljikovega dioksida. Na prostem pa je ta koncentracija najverjetneje tako majhna, da infektivne ličinke niso dosegle zadovoljive učinkovitosti. Čeprav je selekcija pomembna za izboljšanje določenih lastnosti entomopatogenih ogorčic, bi morda bilo bolje, da se raziskave v prihodnosti osredotočijo zgolj na tiste vrste ogorčic, ki lahko brez umetne selekcije parazitirajo določene organizme (Gaugler, 2002).

Z umetno selekcijo entomopatogenih ogorčic so bili doslej uspešni pri izboljševanju njihove infektivnosti pri nizkih temperaturah in pri povečevanju odpornosti na nematicide. Seveda obstaja pri metodi umetne selekcije tudi določena stopnja tveganja. Vprašanje, ki se postavlja mnogim raziskovalcem je, ali lahko pride do tega, da bi se pri umetni selekciji začele pojavljati lastnosti, ki jih s procesom nismo želeli ustvariti. Včasih namreč lahko pride do tega, da se določena fenotipska lastnost vrne v prvotno stanje (Gaugler, 2002).



Slika 2: Sistem selektivnega križanja

### 2.9.1.2 Mutageneza

Genotipske lastnosti v organizmu lahko spremenimo z mutagenezo, vendar pa je slabost te metode lastnost, da je na enkrat lahko spremenjen le en gen. Slabost mutageneze je, da navadno povzroča inhibiranje genov, zato ni najbolj ustrezna metoda pri vnosu novih genetskih informacij. Mutageneza je uporabna, vendar inhibira negativne regulatorje genske izraznosti (ekspresije) in je lahko zaradi tega pomembna pri izgradnji ekspresije zaviralnih genov. Osnovna ekspresija določenih genov, ki delujejo odzivno na strese, ima velik pomen pri varovanju entomopatogenih ogorčic in njihovih simbiotskih bakterij pred okoljskimi stresnimi dejavniki. Naslednja slabost mutageneze je, da z njo zelo težko oblikujemo uspešno selekcijo. Oblikovanje mutantnih selekcij je mnogo težja pri diploidnih ogorčicah kot pri njihovih haploidnih simbiotih (bakterijah). V diploidnih organizmih je večina mutacij recesivnih in fenotipska izraznost mutiranih genov pri gensko spremenjenih entomopatogenih ogorčicah bi bila mogoča le pri homozigotih (Gaugler, 2002)

### 2.9.1.3 Genski inženiring

Vpliv genskega inženiringa na izboljšanje lastnosti je mnogo bolj viden pri gensko spremenjenih mikroorganizmih (GMO). Ti so bili prvotno uporabljeni kot raziskovalna orodja, vendar so danes široko uporabljeni v biotehnološki industriji za proizvodnjo različnih encimov in farmacevtskih sredstev; kot so hormoni, rastni regulatorji in antibiotiki. V zadnjih 25 letih je prišlo do velikega napredka tudi pri izražanju heterolognih genov pri transgenih živalih, kot so ogorčice (1986), *Drosophila melanogaster* (1982), ribe (1985), laboratorijske miši (1974) in domače živali (1989). Do izjemnega napredka je prišlo tudi pri genskem inženiringu rastlin (1989, 1994). Aplikacija gensko spremenjenih tehnik pri živalih in rastlinah je pripeljala do novih odkritij na področjih genetike in biologije, kot na primer v strukturi in ekspresiji genov, razvojni biologiji, odpornosti na bolezni, onkologiji, imunologiji in medicinski genetiki. Tehnike prenašanja genov imajo velik potencial v živalski in rastlinski produkciji, na področjih odpornosti na bolezni, okoljskega stresa, izboljšave rastnih regulatorjev in vsebnosti hranil kot tudi pri genskem „kmetovanju“.

Entomopatogene ogorčice in njihove simbiotske bakterije imajo taksonomsko sorodna rodova, ki se uporabljata kot modela v molekularni genetiki - *Caenorhabditis elegans* (ogorčica) in *E. coli* (bakterija). Porodila se je misel, da bi se tehnike, ki so razvili za ta modelna organizma, uporabljale tudi za entomopatogene ogorčice in njihove simbiotske bakterije, sam razvoj transgenih entomopatogenih ogorčic pa bi bil zaključen v nekaj letih. Raziskovalci so mnenja, da bo pot do nastanka transgenih entomopatogenih ogorčic vseeno nekoliko daljša, kajti premagati bo treba mnogo ovir. Ena do največjih težav je nedvomno

pomanjkanje nekaterih pomembnih informacij o entomopatogenih ogorčicah in simbiotskih bakterijah (Gaugler, 2002).

Veliko željenih fenotipov je rezultat skupne dejavnosti različnih genov (poligenske lastnosti) in so zato manj primerni za genski inženiring. Zato bo potrebno prepoznati gene, katerih produkti neposredno vplivajo na izražanje fenotipa transgenih entomopatogenih ogorčic in njenih simbiotskih bakterij ali na ciljni gen, ki kodira regulacijo encimov v ključnem razcepu metabolne poti.

Razviti so že bili protokoli za uspešno transformacijo *C. elegans* z mikro vbrizgavanjem DNK v hermafroditno gonado (1994). V *C. elegans* se je vnesena DNK zbrala z homologno rekombinacijo v velik kompleks, ki je vseboval na stotine kopij vnesenega gena. Ta kompleks se navadno podvojuje kot ekstrakromosomalna zbirka. DNK ki v ekstrakromosomalni zbirki pri vsaki delitvi ni zanesljivo prenesena do hčerinskih celic, vodi k genetskemu mozaiku in ne-Mendlovim modelom dedovanja. V želji, da bi vključili transformirano DNK v kromosome *C. elegans*, so bile transformirane ekstracelularne zbirke podvržene  $\gamma$ -radiaciji, njihovi potomci pa strogi selekciji za stabilno dedovanje transgenov (Gaugler, 2002).

Uspešna transformacija z mikro vbrizgavanjem HP88 rodu *Heterorhabditis* je bila potrjena v letu 1995 (Hashmi). Transkripcija obveščevalnega gena lac-Z, ki jo prenaša promotor za toplotni stres pri *C. Elegans*, je bila ravno tako odkrita (Hashmi, 1995) v telesu, mišičnini in hipodermu transformirane ogorčice iz rodu *Heterorhabditis*.

Mikro vbrizgavanje je tehnično zahtevno in dolgotrajno. Vendar bi bili zapiski o masovni transformaciji rodu *Heterorhabditis* zelo zaželjeni. Razvoj transformacije za rod *Heterorhabditis* bi imel mnogo prednosti: veliko število živali bi lahko tretirali v enem samem dnevu, prenos DNK neposredno v jedro bi lahko povečal pogostnost transformacij; z mikro delci bi lahko »streljali« v jajčeca, ličinke ali odrasle osebkke ogorčic, in ker je že zelo majhna količina takšnih manipulacij pri ogorčicah upravičena, bi se lahko zgodilo, da bi bila življenska doba ogorčic podaljšana.

## 2.9.2 Cilji genskih izboljšav

Glavni cilji genskih izboljšav pri obeh rodovih entomopatogenih ogorčic so povečati učinkovitost, odpornost na okoljski stres in razvoj tolerantnih vrst na sušo.

### 2.9.2.1 Učinkovitost

Učinkovitost entomopatogenih ogorčic v laboratorijskih razmerah in na prostem se največkrat razlikuje. Entomopatogene ogorčice so bile v laboratorijskih testih visoko patogene, LD<sub>50</sub> je znašala od 3 do 30 infektivnih ličink/osebke, v odvisnosti od vrste ogorčice in vrste ciljnih osebkov, vendar pa te vrednosti niso veljale za poskuse na prostem (Bedding in sod., 1983). Za ustrezno učinkovitost entomopatogenih ogorčic na prostem, je priporočljivo na hektar zemljišča aplicirati  $2.5 \times 10^9$  ogorčic. Če bi bila učinkovitost entomopatogenih ogorčic večja, bi bilo lahko število infektivnih ličink na hektar mnogo nižje, posledično pa bi bili nižji stroški tovrstnih bioinsekticidov, s čimer bi bili kupcem lažje dostopni.

Razlike v učinkovitosti entomopatogenih ogorčic v laboratoriju in na prostem so pogojene z mnogimi dejavniki (Bedding in sod., 1983). Med njimi so gibanje ogorčic v tleh, sposobnost iskanja gostiteljev, specifičnost za gostitelje, penetracija v gostitelje, odpornost na imunski sistem gostiteljev in uspešnost prenosa simbiotskih bakterij v gostitelje. Takšno kompleksno obnašanje in fiziološke lastnosti so rezultat delovanja velikega števila interakcijskih genov (geni, ki vplivajo drug na drugega). Tako bi bilo selektivno križanje ustrezen način, pri katerem bi bile genske izboljšave, izražene na fenotipu, pomembne za učinkovitost entomopatogenih ogorčic. Seleksijski poskusi bi uspeli, če bi bila že ena sama lastnost selekcionirana in bi posledično selekcionirali še nadaljnjo eno oziroma dve drugi lastnosti (Gaugler in sod., 1989).

Mnogi laboratorijski poskusi so pokazali, da bo v ugodnih razmerah za okužitev le 13 % infektivnih ličink povzročilo infekcijo ob istem času (Gaugler in sod., 1989). Čeprav imajo lahko razmere mediju pomemben vpliv na infektivnost, je odstotek hkratne infektivnosti infektivnih ličink vrstno specifična lastnost. To daje slutiti, da je odstotek hkrati aktivnih infektivnih ličink gensko pogojen in je ustrezen za spreminjanje. Če je aktivacija v infektivno stanje odvisna od vpliva okolja na infektivne ličinke, potem bi bila mutageneza najbolj primeren način modifikacije, v smislu aktivacijskega sistema (Gaugler, 2002).

### 2.9.2.2 Odpornost na okoljske ekstreme

Izboljšanje fiziologije in biokemičnih poti entomopatogenih ogorčic, s katerimi bi povečali stopnjo preživetja oziroma infektivnost infektivnih ličink v neugodnih okoljskih razmerah (nizke ali visoke temperature, v povezavi z nizko talno vlago, oziroma na listih), bi vplivalo na večjo uporabnost entomopatogenih ogorčic kot biotičnega načina zatiranja škodljivih organizmov. Mnoge zahtevne fiziološke lastnosti, ki so odgovorne za fiziološko toleranco živali, so v naravi poligenske. Za spreminjanje teh lastnosti bi bila najbolj smotrna uporaba selektivnega križanja. Kakorkoli že, tedaj, ko je regulacija genov vključena v kontrolo ekspresije večih genov in v kontroliranje metaboličnih poti, bi bila prav tako priporočljiva mutageneza (Gaugler, 2002).



Griffin in Downes (1994) sta poročala o uspešni selekciji ogorčice iz rodu *Heterorhabditis* za izboljšanje infektivnosti pri nizkih temperaturah, O'Leary in Burnell (1998) pa sta izolirala (osamila) na sušo odporne vrste iz istega rodu z mutagenozo. Tedaj ko biokemična in molekulska genetika jasno nakazujeta, da znani gen lahko vpliva na »okoljsko psihologijo« entomopatogenih ogorčic, bi lahko izgradnja transgenih ogorčic prinesla napredek.

### 2.9.2.3 Anhidrobiotične vrste

Najdba vrst iz rodov *Heterorhabditis* in *Steinernema*, ki bi bile lahko neomejeno dolgo shranjene v suhem stanju, bi imela veliko prednosti pri shranjevanju in posledično življenski dobi ogorčic na trgovskih policah.

Anhidrobioza (izsušitev) je široko razširjen pojav. Različni organizmi lahko neugodne okoljske razmere preživijo v stanju izsušitve telesa, pri katerem gre za biokemične in fiziološke spremembe v telesu obravnavanega osebk. Grewal (1998) je ugotovil, da je sinteza trehaloze kritična za doseg anhidrobiotičnega stanja. Potrdil je, da *S. carpocapsae* sintetizira trehalozo kot odgovor na osmozo. Znano pa je, da imajo vse entomopatogene ogorčice vključno z omenjeno vrsto, omejeno možnost vstopa v anhidrobiotično stanje. Higa in Womersley (1993) sta dokazala, da trehaloza za anhidrobiotično stanje pri ogorčici *Aphelenchus avenae* nima pomena. Ugotovila pa sta, da je v sušnem obdobju kljub sintezi trehaloze potrebno določeno obdobje počasnega sušenja (vlaga, ki se počasi sprošča), da ogorčica vstopi v anhidrobiotično stanje.

Do danes na molekulskem nivoju še ni bilo raziskav v zvezi s pojavom anhidrobioze pri živalih. Trenutno raziskave molekulske genetike v preučevanju anhidrobioze potekajo na rastlini *Craterostigma plantagineum* Hochst. S temi študijami bodo identificirali zbir prepisovalne DNK (cDNK). Če se bo na nivoju molekulske genetike pokazala podobnost med pojavnostjo anhidrobioze pri rastlinah in živalih, bi bili metodi selektivnega križanja in mutageneze najbolj obetavni za genske izboljšave anhidrobiotičnega potenciala entomopatogenih ogorčic.

## 2.10 SIMBIONTSKE BAKTERIJE ENTOMOPATOGENIH OGORČIC

### 2.10.1 Sistematika

Družina: Enterobacteriaceae

Rodova: *Xenorhabdus* in *Photorhabdus*

Ko govorimo o entomopatogenih ogorčicah ne moremo brez omembe bakterij, ki živijo z njimi v simbiotsko-mutualističnem odnosu. Z družinama ogorčic Steinernematidae in Heterorhabditidae sta povezana rodova bakterij *Photorhabdus* in *Xenorhabdus*. Bakterije se nahajajo v črevesju infektivnih ličink (Burnell in Stock, 2000).

#### 2.10.1.1 Rod *Xenorhabdus*

V rod *Xenorhabdus* štejemo devet vrst bakterij, in sicer: *Xenorhabdus nematophila* (Poinar in Thomas), *X. bovienii* Akhurst, *X. poinarii* Akhurst, *X. beddingi* Akhurst (Kaya, 2000), *X. japonica* Nishimura s sod., *X. budapestensis* Lengyel, *X. ehlersii* Lengyel, *X. innexi* Lengyel in *X. szentirmaii* Lengyel.

Celice bakterij iz rodu *Xenorhabdus* so asporogene, paličaste, velike 0,3-2 x 2-10 µm in Gram negativne. So fakultativni anaerobi. Najustreznejša temperatura za njihovo rast je okoli 28°C ali manj, vendar so nekatere vrste sposobne življenja tudi pri 40°C. Doslej so našli bakterije iz rodu *Xenorhabdus* samo v prebavnem traktu entomopatogenih ogorčic iz družine Steinernematidae in v žuželkah, ki so jih parazitirale omenjene ogorčice (Gaugler, 2002).

#### 2.10.1.2 Rod *Photorhabdus*

V sožitju z entomopatogenimi ogorčicami iz družine Heterorhabditidae živijo bakterije iz rodu *Photorhabdus*. Ta rod sestavlja do sedaj ugotovljenih šest vrst bakterij: *Photorhabdus luminescens* Akhurst, *P. luminescens* subsp. *laumondii*, *P. luminescens* subsp. *akhurstii*, *P. temperata*, *P. temperata* subsp. *temperata* in *P. asymbiotica*.

Celice bakterij iz rodu *Photorhabdus* so asporogene, paličaste, velike 0,5-2 x 1-10 µm in Gram negativne. Premikajo se s pomočjo bička. Bakterije iz tega rodu so ravno tako fakultativno anaerobne. Najustreznejša temperatura za njihovo rast je 28°C ali manj. Obstajajo tudi vrste, ki rastejo pri temperaturah 37-38°C (Gaugler, 2002).

## 2.10.2 Razlike in podobnosti med rodovoma *Xenorhabdus* in *Photorhabdus*

### 2.10.2.1 Razlike

Med bakterijami iz obeh rodov obstajajo razlike (Stackebrandt in sod., 1997). Ena izmed razlik je, da se izolati roda *Xenorhabdus* svetijo, medtem ko se bakterije iz roda *Photorhabdus* ne svetijo. Bakterije iz roda *Photorhabdus* so fotoluminiscenčne, to lastnost pa se uporablja kot način determinacije in določanja stopnje parazitiranosti žuželk z ogorčicami. Intenzivnost pojava luminiscence je največja v prvih 72 urah po infekciji. Razlika se odraža tudi v barvi poginulega gostitelja, saj je lahko gostitelj po okužbi z bakterijo iz roda *Photorhabdus* rdeče ali škrlatne, rumene, oranžne, včasih tudi zelene barve, medtem ko je poginula žuželka, okužena z bakterijo iz rodu *Xenorhabdus* rumenorjave, oker, sive ali temno sive barve.

Bakterije iz rodu *Xenorhabdus* živijo v simbiotsko mutualističnem odnosu le z entomopatogenimi ogorčicami iz družine Steinernematidae. Simbiotsko mutualističen odnos z ogorčicami iz družine Heterorhabditidae pa tvorijo le bakterije iz rodu *Photorhabdus*.

### 2.10.2.2 Podobnosti

Za oba rodova bakterij je značilno da sproščata toksine, hidrolitične eksoencime, ki delujejo na metabolične poti v gostitelju. Metabolne poti se prekinajo in gostitelj v končni fazi pogine (sproščanje toksinov in encimov se prične od 30 minut do 5 ur po vstopu ogorčice v gostitelja).

Bakterije proizvajajo tudi antibiotik 3,5 dihidroksi-4-izopropilstilben, s katerim zavirajo delovanje drugih mikroorganizmov na mrtvega gostitelja, tako da simbiotska ogorčica, ki se z njim prehranjuje, nima konkurentov pri prehranjevanju. Oba rodova bakterij sta Gram negativna kot tudi fakultativno anaerobna. Gostitelj se brani pred okužbo z bakterijami iz rodov *Photorhabdus* in *Xenorhabdus* s fagocitozo, ko posebne celice obdajo bakterijo in jo kasneje požro. Za oba rodova bakterij je skupna izjemno visoka stopnja virulentnosti ( $LD_{50} < 100$  bakterijskih celic).

## 2.10.3 Entomopatogene ogorčice in njihove simbiotske bakterije

Bakterije, ki so v simbiotskem odnosu z entomopatogenimi ogorčicami iz rodu *Steinernema*, pripadajo rodu *Xenorhabdus*, medtem ko bakterije, ki so simbiotskem odnosu z entomopatogenimi ogorčicami iz rodu *Heterorhabditis*, pripadajo rodu *Photorhabdus*. Vsaka vrsta entomopatogenih ogorčic je v simbiotsko-mutualističnem odnosu samo z eno vrsto bakterije (preglednica 1). Ena vrsta bakterije pa je lahko v

simbiontsko-mutualističnem odnosu z več vrstami entomopatogenih ogorčic. Odnos med entomopatogenimi ogorčicami iz rodov *Heterorhabditis* in *Steinernema* ter bakterijami iz rodov *Photorhabdus* in *Xenorhabdus* ni obvezen, saj lahko tako ogorčice kot tudi bakterije v laboratorijskih pogojih gojimo ločeno. V nasprotju z drugimi ogorčicami (Rhabditida), ki se lahko hranijo z različnimi bakterijami, so entomopatogene ogorčice razvile zelo tesen simbiontsko-mutualističen odnos s točno določenimi vrstami bakterij. Simbiontska bakterija preoblikuje nekatere proteine gostitelja v substrat, na katerem se ogorčice lahko razvijajo in razmnožujejo, ogorčica pa bakteriji omogoči vstop v gostitelja, kjer se tudi sama lahko hrani in razmnožuje (Burnell in Stock, 2000).

Preglednica 1: Entomopatogene ogorčice in njihove simbiotske bakterije (Kaya, 2000)

<b>Vrsta entomopatogene ogorčice</b>	<b>Simbiotska bakterija</b>
<i>Steinernema kraussei</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinernema abbasi</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinernema arenarium</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>Steinernema affine</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinernema bicornutum</i>	<i>Xenorhabdus nematophila</i>
<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Xenorhabdus poinarii</i>
<i>Steinernema cubanum</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>Steinernema feltiae</i>	<i>Xenorhabdus japonica</i>
<i>Steinernema glasseri</i>	<i>Xenorhabdus beddingii</i>
<i>Steinernema intermedium</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinernema kushidai</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinernema longicaudum</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinernema monticulum</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinernema puertoricense</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinernema rarum</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinernema riobrave</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinernema scapterisci</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Steinernema serratum</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> subsp. Brecon	<i>Photorhabdus luminescens luminescens</i>
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> subsp. HP88	<i>Photorhabdus luminescens laumondii</i>
<i>Heterorhabditis indica</i>	<i>Photorhabdus luminescens akhurstii</i>
<i>Heterorhabditis zealandica</i>	<i>Photorhabdus temperata</i>
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> subsp. NC	<i>Photorhabdus temperata</i>
<i>Heterorhabditis megidis</i> Nearctic	<i>Photorhabdus temperata</i>
<i>Heterorhabditis megidis</i> Palaearctic	<i>Photorhabdus temperata temperata</i>

#### 2.10.4 Razmnoževanje simbiotskih bakterij

Za simbiotske bakterije iz rodov *Photorhabdus* in *Xenorhabdus* je značilno, da se razmnožujejo v žuželkah (gostitelju) in mirujejo v ogorčicah. Do sedaj še ni bilo dokazano, da bi se bakterije razmnoževale že v črevesju infektivnih ličink. Bakterijska okužba se začne šele po vstopu infektivne ličinke v telo gostitelja. Ko infektivne ličinke iz rodu *Steinernema* parazitirajo gostitelja, sprostijo snovi, ki nevtralizirajo antimikrobne snovi parazitirane žuželke. Dosedaj še ni bilo ugotovljeno, da bi podobno storile infektivne ličinke entomopatogenih ogorčic iz rodu *Heterorhabditis*. Infektivne ličinke obeh rodov sprostijo bakterije v gostitelje. V telesu gostiteljev se simbiotske bakterije hitro razmnožujejo in v 48 do 72 urah po vstopu ogorčice v gostitelja povzročijo njegovo smrt. Hemolimfa gostitelja predstavlja bogat medij za bakterijo, saj se v njej hitro množi, sprošča toksine in encime ter tako povzroči smrt gostitelja (Burnell in Stock, 2000). Manjši gostitelji lahko poginejo v nekaj minutah, kar je najverjetneje posledica mehanske poškodbe (Kaya in Koppenhöfer, 1999). V večini primerov pa gostitelj pogine zaradi zastrupitve. V poginulem gostitelju ogorčice nadaljujejo svoj življenjski cikel in se hranijo z bakterijsko biomaso in z bakterijsko pridelanim tkivom gostitelja (Burnell in Stock, 2000).

#### 2.10.5 Virulentnost simbiotskih bakterij in vloga entomopatogenih ogorčic

Bakterija je virulentna, če je za LD<sub>50</sub><sup>1</sup> potrebnih manj kot 10.000 bakterijskih celic (Bucher, 1960). Večina bakterij iz rodu *Xenorhabdus* je zelo patogena za ličinke voščene vešče (*Galleria mellonella*), saj znaša LD<sub>50</sub> manj kot 100 bakterijskih celic. Večina bakterij iz obeh rodov (*Photorhabdus* in *Xenorhabdus*) je zelo virulentna pri vnosu neposredno v telo ličink nekaterih vrst žuželk. Poročajo tudi o LD<sub>50</sub> pri vnosu samo ene bakterije v ličinko (Gaugler, 2002).

Potrjena je bila tudi prvotna hipoteza Steiner-ja, Fox-a in Glaser-ja, da ogorčice same proizvajajo snovi, ki so toksične za gostitelja (Smart, 1995). Dokazano je, da ena sama ogorčica *Steinernema carpocapsae*, brez simbiotske bakterije, v več tednih povzroči smrt ličinke voščene vešče. Pet ogorčic *S. carpocapsae*, brez simbiotske bakterije, lahko že v štirih tednih povzroči smrt ličinke voščene vešče. Vendar pa ta pojav patogenosti ogorčic brez prisotnosti bakterije ni pravilo. Infektivne ličinke ogorčic *Heterorhabditis bacteriophora* in *H. megidis* brez simbiotske bakterije ne morejo povzročiti smrti ličink voščene vešče. Ogorčice iz rodu *Heterorhabditis* ne morejo ubiti gostitelja brez prisotnosti bakterije *Photorhabdus luminescens*, medtem ko nekatere ogorčice iz rodu *Steinernema* proizvajajo toksine, ki pripomorejo k poginu gostitelja (Gaugler, 2002).

---

<sup>1</sup> LD<sub>50</sub> je srednja letalna (smrtna) doza – odmerek (količina) kake aktivne snovi, ki povzroči smrt 50 % poskusnih organizmov, ki so strup sprejeli; izražamo jo v mg/kg žive teže. Kolikor večja je vrednost LD<sub>50</sub>, toliko manj je snov strupena in nasprotno (Maček in Kač, 1990)

## 2.10.6 Metabolizem simbiotskih bakterij in simbioza z ogorčicami

V laboratorijskih pogojih je bilo na gojiščih bakterij iz rodov *Xenorhabdus* in *Photorhabdus* dokazanih več kot 30 sekundarnih metabolitov. Ti so lahko zelo pomembni tudi v medicini, kmetijstvu in biotehnologiji, saj nekateri delujejo kot antibiotiki, fungicidi, insekticidi, nematicidi in viroci (Gaugler, 2002).

Vedno, ko govorimo o entomopatogenih ogorčicah ne moremo mimo njihovega simbiotsko mutualističnega odnosa z bakterijami. Infektivne ličinke nudijo bakterijam zaščito in bivališče, saj prostoživeča bakterija ne bi bila sposobna preživetja v tleh. V gostitelju se bakterije ne morejo braniti pred antibakterijsko obrambo gostitelja (fagocitoza), zato jih ogorčice v gostitelju varujejo s tem, da zaustavijo antibakterijsko obrambo gostitelja. V zameno pa bakterije ogorčici hitro ubijejo gostitelja in s proizvodnjem antibiotikov (3,5 dihidroksi-4-izopropilstilben), ki onemogočajo razvoj tekmovalnim mikroorganizmom, ustvarjajo ustrezno okolje za razvoj entomopatogenih ogorčic. Bakterije preoblikujejo telo gostitelja v hrano, ustrezno za ogorčice in tudi same predstavljajo ogorčicam vir hrane (Kaya in Koppenhöfer, 1999).

## 2.10.7 Simbiotske bakterije in genetika

### 2.10.7.1 Uvod v raziskave

Nekaj napredka je bilo napravljenega v metodologiji za prenos DNK v bakterijska rodova *Xenorhabdus* in *Photorhabdus*, ki živita v simbiotsko mutualističnem odnosu z entomopatogenimi ogorčicami. Nekateri vektorji bakterije *E. coli*, ki vključuje tudi nekatere plazmide in fage  $\gamma$ , so bili vnešeni v nekatere rodove simbiotskih bakterij, vendar ne vse. Kot primer: fag  $\gamma$  je bil uporabljen pri transdukciji *Xenorhabdus bovienii*, vendar ne tudi pri kaki vrsti iz rodu *Photorhabdus*, kljub temu da so le-te v svojem kasnejšem razvoju sposobne absorbirati fage. V obeh primerih, morajo biti celice »inženirane« z genskim kodiranjem proteinskih receptorjev *E. coli*, preden jih vnesemo. Kitajski znanstvenik Xu (1994) je uspel transformirati *X. nematophilus* z pHX1 plazmidom, vendar pa sta bila na drugi strani ameriška znanstvenka neuspešna pri vnosu istega plazmida v bakterijo iz rodu *Photorhabdus*, kljub temu, da sta nek drug plazmid pBR322 uspešno vnesla v bakterijo. Ti primeri nakazujejo, da je metodologija transformacije in klonskih vektorjev lahko pri nekaterih vrstah neučinkovita, spet pri drugih ravno obratno. Učinkovitost sprejemanja DNK je pri obeh rodovih simbiotskih bakterij entomopatogenih ogorčic na splošno slaba in se slabo izraža pri novih rodovih (Gaugler, 2002).

### 2.10.7.2 Cilji izboljšav

Glavni cilj izboljšav rodov *Xenorhabdus* in *Photorhabdus* je povzročanje specifičnih bolezenskih znamenj na gostiteljih, doseganje simbiotske specifičnosti, odpornosti na okoljske ekstreme kot so mraz, suša ipd.

Do sedaj je bila najbolj raziskana aktivnost simbiotskih bakterij iz rodov *Photorhabdus* in *Xenorhabdus* na voščeno večjo (*Galleria mellonella*). Ta žuželka je zelo občutljiva na entomopatogene ogorčice, saj znaša LD<sub>50</sub> manj kot 3 bakterijske celice. Ta lastnost ni dejstvo tudi pri ostalih ogorčicah in njihovih gostiteljih. LD<sub>50</sub> bakterije *X. bovinienii* proti žuželki *Tipula oleracea* znaša nad 40.000 bakterijskih celic (Gaugler, 2002).

Obstajata dve vrsti bakterij, ki so sposobne okuževati žuželke: tiste, ki oblikujejo spore in tiste, ki te lastnosti nimajo. Oba rodova simbiotskih bakterij entomopatogenih ogorčic spadata med tiste, ki ne oblikujejo spor. Ta skupina je navadno patogena, ker proizvaja ekstracelularne encime in lipopolisaharide, ki lahko uničijo celice v hemolimfi kot tudi ostale notranje organe. To je razlog smrti okuženih žuželk. Doslej je bilo malo raziskav na področju preučevanja virulentnosti obeh rodov. Znano je, da predstavniki obeh rodov izločajo lipazo, liktinazo in proteazo, ki vplivajo na virulentnost. Lipaza sama ne vpliva na toksičnost, kar pomeni, da na toksičnost najverjetneje vplivajo še mnoge druge snovi, ki jih bakterije proizvajajo. Nekatere frakcije celic iz membran bakterij iz rodu *Xenorhabdus* so se izkazale za netoksične na ličinkah, podobno kot celice *E. coli* in *Bacillus subtilis*. Sklepali so, da je takšna nespecifična toksičnost rezultat aktivacije imunskega sistema žuželk, kot odgovor na vnos tujka vanjo in da je sam gostitelj sposoben uničiti nekatere svoje celice z namenom, da bi uničil tudi patogeno bakterijo. Lipazo izločajo tako žive kot mrtve celice bakterij le, če se te nahajajo v serumu ličink. LPS (lipaza) vpliva na uničenje hemolimfe in ihibira (zavira) nastanek propenoloksidaze, ki predstavlja del imunskega odgovora žuželke na bakterijo (Gaugler, 2002).

Nadaljnje raziskave so pokazale, da je virulentnost v veliki meri odvisna od imunskega odgovora gostitelja in ne toliko od same patogenosti bakterije. Virulentnost bi lahko izboljšali s povečanjem toksične aktivnosti in specifičnosti oziroma z izboljšanjem celic, ki bi se lahko izognile imnskemu sistemu gostitelja (Glazer, 1991).

Iz različnih vrednosti LD<sub>50</sub> je jasno, da so različne vrste simbiotskih bakterij iz rodov *Xenorhabdus* in *Photorhabdus* različno virulentne do različnih gostiteljev. V prihodnosti bo potrebno še veliko raziskav, da bomo dosegli virulentnost bakterij za širok spekter škodljivih žuželk (Gaugler, 2002).

Nekatere študije so pokazale, da je v posameznih primerih rast entomopatogenih ogorčic iz rodov *Steinernema* in *Heterorhabditis* neodvisna od simbiotskih bakterij iz rodov *Photorhabdus* in *Xenorhabdus*. Tudi drugi rodovi bakterij namreč lahko živijo v obeh rodovih ogorčic. Gre torej za nespecifičnost. Ko so simbiotske bakterije izmenjali med



vrstami rodov *Heterorhabditis*, se je le v nekaterih novo nastalih kompleksih pokazala kompatibilnost z infektivnostjo infektivnih ličink. Han (1991) je v svojem poskusu izmenjeval bakterije med vrstami iz rodu *Heterorhabditis* in ugotovil, da je bila pri nekaterih novih kompleksih ogorčica-bakterija patogenost povečana, spet pri drugih pa zmanjšana. To pomeni, da obstaja med posameznimi vrstami bakterij in ogorčic določena stopnja specifičnosti, pri kateri nekatere ogorčice v kompleksu spodbujajo delovanje bakterij, druge ogorčice pa zavirajo to delovanje. Zato lahko v nadaljnjih raziskavah na tem področju pričakujemo izboljšave patogenosti entomopatogenih ogorčic z menjavo kombinacij bakterij in njihovih gostiteljev (ogorčic) v simbiotsko mutualističnem odnosu (Gaugler, 2002).

Entomopatogene ogorčice so neaktivne pri nizkih temperaturah (v našem podnebjju od pozne jeseni do zgodnje pomladi). Rezultati raziskov prilagoditev rodu *Photorhabdus* in vrste *X. nematophilus* na nizke temperature (Clark in Dowds; 1995) in pregled razlik med psihrofilni in mezofili, kot tudi premagovanje nizkotemperaturnega šoka pri drugih bakterijah kažejo, da na to lastnost vpliva več genov. Med temi geni so tudi tisti, ki kodirajo nizkotemperaturni šok in ostale membranske proteine, ki v ta proces vključujejo tudi encime, sodelujoče pri desaturaciji membranskih maščobnih kislin. Zaradi podobnosti ostalih odgovorov na stres je možno, da je manjše število regulatornih genov vključenih v samo ekspresijo prilagoditvenih genov, kar nakazuje, da bi mutacije regulatornih genov povečale učinkovitost ogorčic pri nizkih temperaturah. Kakorkoli že, doslej še ni bilo ugotovljeno, da bi lahko bile tako spremenjene vrste pri nizkih temperaturah virulentne ali bi se razmnoževale (Gaugler, 2002).

Znano je, da so ogorčice občutljive na sušo, vendar pa ta lastnost do sedaj še ni bila preučena na simbiotskih bakterijah. O stopnji prilagodljivosti na sušo so doslej govorili le v hipotetičnem smislu, kar vključuje tudi nastajanje trehaloze, membranskih struktur in kompozicije v kapsulni obliki (Clark in Dowds; 1995). O teh lastnostih ni nič znanega pri bakterijah iz rodov *Xenorhabdus* in *Photorhabdus*, razen tega, da imajo bakterije fluidno membrano tipično za psihrotrope (Clarke in Dowds, 1991) in da primarne oblike tvorijo kapsule (Gaugler, 2002).

Oba rodova simbiotskih bakterij kažeta fenotipsko nestabilnost, znano kot fazna variacija. Take kulture, ki rastejo na eni koloniji v primarni razvojni stopnji (F1), povzročijo nastanek druge razvojne stopnje (F2), ki je v veliki meri odvisna od same vrste. Izkazalo se je, da to predstavlja veliko težav (neugodnosti) v industrijski proizvodnji ogorčic, ker je bil donos druge razvojne stopnje (F2) v vrednosti ene sedmine prve (F1). Poleg tega je primarna razvojna stopnja tista, pri kateri prevladujejo infektivne ličinke ogorčic. Razlog morda v tem, da so te razlike nastale zato, ker je druga razvojna stopnja propadla predvsem na račun encimov in sekundarnih metabolitov, ki jih je izločala prva. Med njimi so tudi ekstracelularni proteini, antibiotiki, lipaze, fimbrije, kapsule in še nekatere druge snovi. Možnost zaradi ohranjanja energije pri sekundarni razvojni stopnji lahko govori v korist nadaljnjega stradanja, precej hitrejšega kot pri prvi razvojni stopnji, kar nakazuje

zmogljivejše sprejemanje hranil. Kulture F2 rodu imajo višjo stopnjo respiratornih encimov (Gaugler, 2002). Avtor zagovarja tezo, da je sekundarna razvojna stopnja mnogo bolj prilagojena na razmere v tleh kot prosto živeče bakterije.

Krasomil-Osterfeld in Ehlers (1994) sta dokazala, da zmanjšanje osmolarnosti v mediju prve razvojne stopnje vpliva na nekatere lastnosti druge. Rezultati njunega raziskovalnega dela nakazujejo, da je najverjetneje mnogo bakterijskih lastnosti blokiranih, ker bi sicer škodile entomopatogenim ogorčicam (npr. prebavnemu sistemu). Ker lastnosti prve razvojne stopnje vplivajo na virulentnost, omenjeno razmerje ni tako enostavno pojasniti. Druga razvojna stopnja *X. nematophilus* se je izkazala za enako virulentno kot primarna po injiciranju (vbrizgavanju) v ličinke metulja *G. mellonella* (Akhurst, 1980). Vendar pa je Dowds (1995) odkril, da je bila prva razvojna stopnja rodu *Photorhabdus* šestkrat bolj virulentna od druge, vendar pa sta kljub vsemu pri 28°C obe imeli LD<sub>50</sub> vrednost za omenjenega metulja manjšo kot 1. Za boljše razumevanje tega pojava bo potrebno v raziskavah uporabiti ustrežnejšega gostitelja kot je *G. mellonella* (Gaugler, 2002).

Očitno je, da bi imelo »mutiranje« rodov *Xenorhabdus* in *Photorhabdus* v stabilno primarno obliko prednost za industrijsko proizvodnjo bakterij. Vendar bi moral biti pomen druge razvojne stopnje v življenjskem ciklu in prilagodljivosti na spremembe okoljskih potreb še mnogo bolje preučen, preden bi z zagotovostjo lahko trdili, da bodo imeli takšni mutanti prednost v aplikaciji na prostem. Mnogo patogenov, še posebno bakterije, so podvržene različnim vrstnim oblikam faznih variacij, ki sodelujejo pri prilagoditvi na različne razmere. Obstaja tudi tehnološki problem razmnoževanja mutantov, ki so popolnoma »zaklenjeni« v prvem rodu. Vse kaže, da gre za multiple regulatorne kontrolorje, ki vplivajo na fazno spreminjanje (prehod iz ene v drugo razvojno stopnjo). Obstaja tudi možnost, da le en sam gen kontrolira delovanje večjega števila regulatornih genov, vendar to zaenkrat še ni bilo odkrito (Gaugler, 2002).

#### 2.10.7.3 Gensko tveganje

Ko bodo entomopatogene ogorčice in njihovi simbionti gensko spremenjeni bo treba čimprej ugotoviti, kako se bodo tako spremenjeni organizmi obnašali v okolju oziroma kakšen vpliv bodo imeli nanj. Gre za vprašanja, v kako veliki meri bodo virulentni, kako bodo vplivali na ciljne organizme, itd.. O okoljskem tveganju gensko spremenjenih organizmov je že veliko znanega. Morebitna tveganja se kažejo zlasti kot:

1. vnos spremenjenih genov gensko spremenjenih organizmov (GMO) v organizme, predvsem v škodljive, kot so patogeni in škodljivci ter
2. možnost, da bi bili gensko spremenjeni organizmi sposobni bolje preživeti v okolju kot njihovi nespremenjeni »starševski« osebki, z neznanimi posledicami na okolje.

Horizontalni prenos genov pri bakterijah s konjugacijo, transformacijo in transdukcijo je bil doslej že dobro preučen. Naravna transformacija in transdukcija s fagom

(bakteriofagom) se navadno veže na ozek gostiteljski niz prenosa med vrstami posameznih bakterij. Pri konjugaciji gre za širši niz prenosa DNK med samim kraljestvom, in ne zgolj med posameznimi vrstami bakterij (Syvanen, 1994). Pomemben dokaz je enostavnost horizontalnega prenosa P-faktor transpozonov v žuželke, podobno je tudi pri ostalih družinah, ki vsebujejo transpozonske elemente, vendar pa je zmožnost le-tega v naravi pri ostalih živalih mnogo manjša oziroma redkejša. Od devetih domnevnih zgledov horizontalnega prenosa jedrnih genov, ki vključuje evkarionte (Syvanen, 1994), je bil na živalskem gostitelju (pražival *Entamoeba histolytica*) ugotovljen le enkrat. Ta ugotovitev kaže na potencialno nevarnost horizontalnega prenosa genov iz gensko spremenjenih organizmov na ostale organizme v ekosistemu, predvsem iz simbiotskih bakterij, mnogo manj pa iz ogorčic. Doslej še niso odkrili nobene vrste bakterije iz rodov *Photorhabdus* in *Xenorhabdus* v tleh, kar nakazuje na dve možnosti. Prva je, da se bakterija iz ogorčice ne sprosti v tla in druga, da v tleh brez ogorčice, kot njenega mutualističnega partnerja ne preživi prav dolgo. Če bodo v prihodnosti ugotovili, da oba rodova simbiotskih bakterij lahko preživita v tleh, bo to pomenilo določeno tveganje horizontalnega prenosa genov na ostale organizme. Trenutno je tudi iz laboratorijskih poskusov znano, da lahko bakterije iz rodu *Photorhabdus* z konjugacijo sprejmejo gene *E. coli*, ki vsebujejo bakteriofage in plazmide. Slednji pa so sposobni transformacije v druge vrste (Dowds, 1994). To nakazuje, da bi se lahko povečalo število patogenih vrst na račun nepatogenih vrst. Obstaja tudi bojazen, da bi bile med nepatogenimi žuželkami tudi neškodljive vrste (polonice, itd.).

Glazer (1991) je pregledal zahteve in strategije za biološko vsebnost izpuščenih bakterij. Govori o dveh pristopih: vnosu onesposobljenih mutacij v rodove in sprostitvi samouničevalnih genov, izraženih iz kontrolnega promotorja. Pri sledečem pristopu obstajata dve težavi:

1. oviranje vrst pri izvrševanju njihovih nalog (biotično varstvo) in
2. težavnost pri preučevanju primerne mutanta za preslabo preučeno vrsto.

Z upoštevanjem poznejših pristopov, so razlogi, ki bi vplivali na regulacijo ekspresije ubijalskih genov v tleh, nizke temperature in stradanje oziroma stohastična kontrola različnih rekombinacij. Težava pri razumevanju samouničevalnih genov je, da je v laboratorijskem poskusu preživela več kot polovica osebkov, kljub izraznosti ubijalskih genov. Pri teh osebkih je najverjetneje prišlo do spontanih mutacij ubijalskega oziroma kakega drugega gena, ki na tega deluje. Kljub temu je možno ustvariti rodove, katerih številčnost bi se lahko krepko zmanjšala pod posebnimi pogoji, vendar pa celotnega števila bakterij ne bi bilo mogoče eliminirati. Dovolj dobra rešitev za zmanjšanje tveganja, bi bilo tako zmanjšanje števila bakterij, kajti celotne eliminacije prej ko slej ne bo mogoče doseči.

Ehlers in Peters (1995) sta preučila možnost tveganja na okolje za veliko število gensko nespremenjenih ogorčic. Njune ugotovitve so bile:

1. rodova *Steinernema* in *Heterorhabditis* sta omejena na življenje v tleh, njun spekter parazitiranja pa je omejen zgolj na žuželke,
2. doslej dostopno znanje nakazuje, da ima aplikacija entomopatogenih ogorčic neznamenit vpliv na neciljne organizme, tudi na koristne žuželke,
3. kljub nadaljnjemu sproščanju ogorčic v okolje, se njihovo število ne bo povečevalo, ampak bo stabilno,
4. število entomopatogenih ogorčic v tleh nadzorujejo (zmanjšujejo) različni talni organizmi (parazitske ogorčice, mikroorganizmi, glive, praživali, predatorske pršice).

Tudi ostale študije so pokazale, da gensko nespremenjene entomopatogene ogorčice nimajo vpliva na okolje. Vprašanje, ki se postavlja je ali so gensko spremenjene ogorčice sposobne dlje preživeti v okolju in če bi bile, kakšen bi bil tedaj njihov vpliv na ostale organizme?

Zaradi tehnoloških težav, do katerih prihaja pri genskem inženiringu entomopatogenih ogorčic in njihovih simbiotskih bakterij, je vsaj v začetku pričakovati, da se bodo gensko spremenjene ogorčice razlikovale od svojih staršev (gensko nespremenjenih ogorčic) v enem oziroma nekaj genih. Vnos gensko spremenjenih entomopatogenih ogorčic bi bil za okolje manj nevaren od vnosa tujerodnih organizmov, ki bi v okolje sprostili veliko število »tujih« genov. Bolj od števila spremenjenih (dodanih, odvzetih) genov, je pomembno, kako bo sprememba genotipa vplivala na fenotip (Tidje, 1989).

## 2.11 UČINKOVITOST ENTOMOPATOGENIH OGORČIC

Učinkovitost ogorčic v smislu biotičnega varstva rastlin pred škodljivimi žuželkami je bila preučevana na mnogih vrstah. Ugotovljeno je bilo, da je lahko njihova učinkovitost spremenljiva – lahko so brez vpliva na žuželke ali pa odlično parazitirajo. Na pojav teh razlik lahko vpliva mnogo dejavnikov. Najpogosteje je vzrok razlik v slabem poznavanju bionomije entomopatogenih ogorčic in njihovih gostiteljev. Med dejavniki, ki jih moramo upoštevati, ko vrednotimo učinkovitost entomopatogenih ogorčic, so ustreznost gostitelja in okolja, način iskanja gostitelja, odpornost gostitelja pred bakterijskimi okužbami in temperaturne zahteve ogorčic in njihovih gostiteljev (Gaugler, 2002).

Dejstvo, ki je ključnega pomena v poznavanju načina parazitiranja entomopatogenih ogorčic je, da lahko parazitirajo le enega gostitelja. V primeru, da parazitirajo neustreznega gostitelja, poti nazaj ni. Ogorčica mora zato prepoznati gostitelja. Pomembno je ali ogorčica išče gostitelja aktivno ali pasivno. Entomopatogena ogorčica je pri iskanju gostitelja uspešnejša, če se gostitelj premika po prostoru drugače kot ona. Vrsti *Steinernema glaseri* in *Heterorhabditis bacteriophora* iščeta gostitelja aktivno. Zaznata ga z vonjem, in sicer s pomočjo CO<sub>2</sub>, ki ga gostitelj oddaja. Drugi način iskanja gostitelja je značilen za ogorčici *Steinernema scapterisci* in *S. carpocapsae*, ki žrtve čakata na mestu. Gostitelja ne zaznata, tudi če je ta od njiju oddaljen le nekaj milimetrov. Za vrsti *S. riobravisi* in *S. feltiae* sta značilna oba načina iskanja gostitelja (Gaugler, 1999). Ko ogorčica najde in prepozna svojo žrtev, mora premagati obrambne mehanizme gostitelja, preden vstopi vanj.

Bakterijska okužba gostitelja ni zagotovljena s parazitiranjem gostitelja. Uspeh okužbe je odvisen predvsem od odpornosti gostitelja na bakterije (Gaugler, 1999). Za voščeno veščo je bilo ugotovljeno, da se odpornost po vstopu entomopatogene ogorčice hitro zmanjša (Brivio in sod., 2002).

Najuspešnejša je uporaba entomopatogenih ogorčic v okolju, ki jim omogoča varovanje pred ekstremnimi okoljskimi razmerami. Učinkovitost ogorčic za parazitiranje gostiteljev je odvisna od sposobnosti preživetja infektivnih ličink, ki pa je zelo omejeno. Že po nekaj urah po nanosu na talno površje jih pogine do 50 %, predvsem zaradi ultravijoličnega sevanja in pomanjkanja vlage. V naslednjih dneh jih vsak dan pogine 5-10 %, tako da jih po enem do šestih tednih preživi le še 1 %. Zaradi nizke stopnje sposobnosti preživetja se entomopatogene ogorčice uporabljajo za zatiranje škodljivih organizmov tedaj, ko so ti v tistem razvojnem stadiju, ki je najbolj dovzeten za ogorčice (Smith, 1999).

Nekatere ogorčice imajo zelo omejen obseg gostiteljev. Vrsta *S. scapterisci* je prilagojena tako le na nekatere gostitelje iz družine Gryllotalpidae (red Orthoptera), druge gostitelje pa skoraj ne napada. Za vrsto *S. kushidai* je značilno, da lahko parazitira le ličinke iz družine Scarabaeidae (Coleoptera) (Kaya, 2000) in se ne more razmnoževati v drugih gostiteljih (Koppenhöfer in Kaya, 2002).

Pri ugotavljanju učinkovitosti entomopatogenih ogorčic za zatiranje rilčkarjev (Curculionidae) je bilo ugotovljeno, da so učinkovite pri višji temperaturi in visoki koncentraciji suspenzije. Ogorčice so bile v tleh učinkovite do pet tednov, vendar se njihova učinkovitost postopoma zmanjševala (Kaya, 2000).

Najbolj dovzetne za napad entomopatogenih ogorčic so žuželke, ki vsaj del svojega razvojnega kroga preživijo v tleh in tiste žuželke, ki živijo v rastlinjaki. Pri zatiranju nadzemskih škodljivcev entomopatogene ogorčice niso tako uspešne, vendar pa med vrstami entomopatogenih ogorčic obstajajo razlike. Nekatere so bolj učinkovite pri zatiranju žuželk, ki živijo na talnem površju ali plitvo v tleh. Takšna vrsta je na primer *S. carpocapsae*. Vrsti *H. bacteriophora* in *S. riobrave* pa sta bolj učinkoviti pri zatiranju žuželk, ki živijo globoko v tleh (Lewis, 2000).

Znano je, da so infektivne ličinke, ki prve zapustijo gostitelja, v primerjavi s tistimi, ki ga zapustijo pozneje, učinkovitejše pri iskanju novega gostitelja, prenašajo višje temperature, a se slabše razporedijo po prostoru in so navadno občutljivejše na sušo (O'Leary in sod., 1998). Učinkovitost entomopatogenih ogorčic za parazitiranje žuželk v tleh se slabša z večjim deležem gline (Kamionek in sod., 1997).

## 2.12 KAPUSOVI BOLHAČI (*Phyllotreta* spp.)

Razred: Insecta

Red: Coleoptera

Družina: Chrysomelidae

Narodna imena v nekaj jezikih

- angleško: flea beetle, lesser striped
- nemško: Erdfloh, Geschweiftstreifiger Erdfloh, Gewellstreifiger Kohlerdfloh
- nizozemsko: kleine gestreepte aardvlo

V Sloveniji poznamo več vrst kapusovih bolhačev rodu *Phyllotreta*, ki napadajo vse kapusnice, oljno ogrščico in repice, redkev in redkvico, črno redkev in številne samonikle križnice. Znane so vrste veliki progasti bolhač (*P. nemorum* L.), progasti bolhač (*P. undulata* Kutsch.), modri kapusov bolhač (*P. nigripes* F.), črni kapusov bolhač (*P. atra* F.) in še nekateri drugi (Vrabl, 1992).

### 2.12.1 Opis

Odrasli osebek: Hroščki so veliki 1,8-2,5 mm. Tiplake so 11-členaste. Čelo je v prečni črti, med očmi, zgoščeno punktirano. Zadnja stegna so odebeljena in v njih je posebni organ, ki omogoča hiter odziv in s tem skakanje bolhačev, če so ti v nevarnosti. Hrošči so sijajne, črne barve, s po eno podolžno-ledvičasto liso na vsaki pokrovki, navadno rumenkaste ali umazano bele barve. Ti lisi po videzu tvorita oklepaj. Posamezna lisa je podolžno, v sredini nekoliko zožena. Samci in samice so si zelo podobni, ločijo se le po srčastem tretjem členku stopalca na sprednjih nogah, ki pri samicah ni tako izrazit. V Sloveniji je iz rodu *Phyllotreta* razširjenih več vrst, ki se med seboj le težko ločijo. Zanesljiva determinacija je mogoča le po spolnih organih.

Jajčece: Jajčeca so eliptične oblike, velika 0,3-0,4 mm. So v glavnem bela. Samica jih odloži na tla v bližini stebela ali na steblo gostiteljskih rastlin. Natančnih podatkov o številu odloženih jajčec za samice ni, predvidevajo pa, da je teh največ do 100 na samico.

Ličinka: Ličinka je bela, s temnejšimi, drobnimi bradavicami na zunanjem robu telesa. Podobna je gosenici, vendar za razliko od te nima trebušnih nog. Ima le tri pare enostavnih oprsnih nog. Glava in kapsula predprsja sta temneje hitinizirani. Na vratnem ščitu in na trebušni strani so kratki trnasti izrastki. Ličinke se hranijo na in v koreninah gostiteljskih rastlin.

Buba: Odrasle ličinke se zabubijo v posebni kamrici v tleh, v bližini korenin. Buba je bela do rumenkasta, na njej so vidne zasnove vseh okončin hrošča. Strokovno jo imenujemo prosta buba (Vrabl, 1992).

### 2.12.2 Razširjenost, širjenje in gostitelji

Vrste iz rodu *Phyllotreta* so postale ubikvisti - s prodajo kapusnic in rastnih substratov so se razširile v vsa zmerna podnebna območja, kjer pridelujejo kapusnice. V Evropi so kapusovi bolhači med najpomembnejšimi škodljivci. Ker so dobri letalci, se zlahka selijo na krajše razdalje, kjer najdejo ustreznega gostitelja. Znani so tudi zgledi migracij bolhača z zračnimi tokovi, saj žuželke dvignejo višje. Zaradi dobre prilagodljivosti se vrsta lahko ustali v večini krajev, kjer najde ustrezno hrano (Vrabl, 1992).

Vrsta je oligofag in se prehranjuje na križnicah. Še posebno mu teknejo: *Brassica oleracea* (vse podvrste, varietete in sorte, od zelja, kolerabice, cvetače, do ohrovtov), *Brassica juncea*, *Brassica napus* (navadna ogrščica), *Brassica rapa* ssp. *oleifera* (oljna repica), *Crambe abyssinica*, *Sinapis alba* (bela gorjušica) in še mnoge druge križnice, še posebno tiste iz rodu *Brassica*. Občasno se pojavlja tudi na rodovih *Reseda* in *Tropaeolum*.

### 2.12.3 Poškodbe

Tipične poškodbe bolhačev so majhne, okrogle izjede, v glavnem na zgornji strani listov, velikosti do 4 mm. Te so vidne kot luknjice v listih, ali kot okrogle jamice, če so listi debelejši. Izjede se lahko združujejo in ob večji gostoti zavzamejo večji del listne površine. Značilnost poškodb bolhačev je posamično izjedanje listne ploskve, ki je neenakomerno raztreseno po celotnem listu in ni ostro omejeno z žilami. Občasno se bolhači hranijo tudi na neolesenelih steblih in listnih pecljih.

Bolhači najraje napadajo mlade, nežne rastline. Te zaradi poškodb listnih ploskev, ob večji gostoti bolhačev, hitro hirajo in lahko na koncu propadejo. Bolhači so najnevarnejši mladim kalečim in presajenim sadikam. To je od konca aprila, do začetka junija, navadno pri vzgoji mladih kapusnic, ob vzniku oljne ogrščice in oljne repice pa v avgustu in začetku septembra. V poznejših razvojnih stadijih gostiteljev so bolhači sicer manj nevarni, vendar pa moramo njihovo število stalno spremljati in ob množičnejšem pojavu ustrezno ukrepati.

### 2.12.4 Razvojni krog

Odrasli hrošči prezimijo v ostankih organske snovi v tleh, gozdni stelji, v mahovih na debelih, stelji ob živih mejah ipd.. Ko posije prvo spomladansko sonce, hrošči pridejo iz prezimovališč. Hranijo se čez dan, na različnih križnicah. Zgodaj spomladi, ko še ni na voljo veliko rastlin, najdemo hrošče na samoniklih križnicah ter na oljni ogrščici in oljni repici. V tem času lahko močno poškodujejo posevke obeh oljnic, še posebno, če so ti v bližini prezimovališč bolhačev. Kapusov bolhač se lahko hrani tudi na komaj kalečih



rastlinah, še preden te vzniknejo iz tal. To sicer ni pogosto, dogaja pa se na rahlih tleh. Na to moramo biti pozorni, če sadike kapusnic vzgajamo na prostem. Po dopolnilnem hranjenju se bolhači spomladi pariyo, nato pa samice postopoma odlagajo jajčeca. To obdobje traja od maja do junija. Embrionalni razvoj traja približno en teden, zatem pa se izležejo ličinke, ki se hranijo z objedanjem na ali v koreninah gostiteljskih rastlin (Vrabl, 1992).

Škoda, ki jo povzročajo ličinke, je zaradi velikosti rastlin in prikritosti ličink v tleh, vizualno manj opazna in je literatura posebno ne omenja. Glede na številčnost bolhačev pa najverjetneje tudi ta, še posebno na majhnih rastlinah, ne more biti zanemarljiva. Takšne rastline zaradi poškodovanih korenin počasneje in neenakomerno rastejo. V odvisnosti od vlage in temperature, ličinke odrastejo v 2-6 tednih. Zatem v površinskem sloju tal oblikujejo komoro, v kateri se zabubijo. Novi rod bolhačev se pojavi od julija naprej. Ti se hranijo na istih gostiteljskih rastlinah, ki so dotlej že zrastle, zato je škoda zaradi hranjenja manjša. Pri zelju so poškodbe omejene na zunanje liste, ki niso del glav in so zato brez večjega gospodarskega pomena. Nov rod bolhačev se v avgustu in koncu septembra odpravi na prezimovanje. Kapusov bolhač ima le eno generacijo na leto (Vrabl, 1992).

### **2.12.5 Varstvo**

Ob množičnem pojavu bolhačev, je edini učinkovit ukrep škropljenje z insekticidi. Varstveni ukrepi, kot je biotično varstvo s parazitoidi in plenilci, so za bolhače premalo učinkoviti. Med učinkovitejše agrotehnične ukrepe štejemo vmesno saditev kitajskega kapusa. Zaradi selektivne izbire bolhačev, ki imajo najraje kitajski kapus, jih namreč lahko uspešno privabimo na to kapusnico in jih ciljno zatiramo le na njej. Pri tem se dobro obnese kitajski kapus posajen na robu parcele, kjer pridelujemo druge vrste kapusnic. Tovrstne rešitve pa so odvisne tudi od tehnologije in obdobja pridelave kapusnic (Vrabl, 1992).

Manjše nasade v biološki pridelavi je mogoče pred kapusovimi bolhači zavarovati tudi s prekrivanjem nasada s kovertanom ali agrilom ter podobnimi mrežastimi pokrivali, zlasti v času od sajenja do obraščanja rastlin. Pri tem moramo paziti, da bolhači ne pridejo pod pokrivalo in da je to dobro pritrjeno na talno površino.

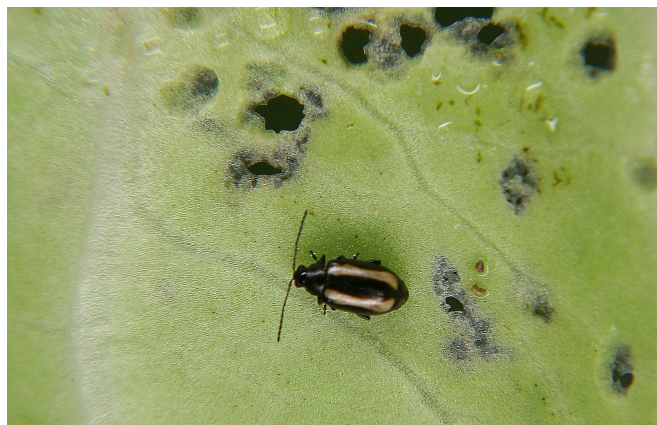
Bolhači so najnevarnejši mladim rastlinam, ki so nežne in imajo majhno listno površino. Takšne rastline bolhači najraje napadajo. Ko sadike presadimo na prosto, jih vsak dan pregledujemo na pojav bolhačev. Ti se v toplem in sončnem vremenu lahko hitro pojavijo in v dveh do treh dneh uničijo večino nasada. Zato je pomembno, da posevek pravočasno zavarujemo. Ker se bolhači hranijo na rastlinah le podnevi, jih ni težko zatirati (Vrabl, 2002).

Za zatiranje bolhačev uporabljamo v glavnem kontaktne in želodčne insekticide, katerim dodamo omočila, da se bolje oprimejo voščenega poprha kapusnic in bolhačev. Škropimo,

ko je prizadete 10 % listne površine mladih rastlin, lahko pa že prej, če opazimo množičen pojav bolhačev. Starejših rastlin navadno ne škropimo, razen, če se pojavijo na delih, ki jih tržimo (brstični ohrovt) ali želimo preprečiti veliko številčnost prezimitve. Najustreznejši čas škropljenja je dopoldan, preden se bolhači začnejo hraniti. Število škropljenj je odvisno od hitrosti razvoja rastlin, vremenskih razmer v tem obdobju, učinkovitosti pripravka in pritiska bolhačev s sosednjih zemljišč. Navadno zadostuje 1-3 škropljenja.



Slika 3: Kapusov bolhač (*Phyllotreta* spp.) (foto: M. Jeran)



Slika 4: Progasti kapusov bolhač (*Phyllotreta undulata* Kutsch.) (foto: M. Jeran)

### 3 MATERIAL IN METODE DELA

Poskus je potekal na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete ter v Entomološkem laboratoriju na Katedri za entomologijo in fitopatologijo, na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

#### 3.1 ENTOMOPATOGENE OGORČICE

Ogorčice *Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae*, *Heterorhabditis bacteriophora* in *H. megidis* smo za namen raziskave naročili pri podjetju Koppert na Nizozemskem. Tri vrste ogorčic so bile poslani v obliki biopripravkov, katerih aktivna snov so infektivne ličinke omenjenih vrst ogorčic. Ogorčice *Steinernema carpocapsae* nismo prejeli v obliki biopripravka, ampak so nam jih poslali iz raziskovalnega laboratorija podjetja Koppert b.v. V poskus smo tako vključili naslednje biopripravke:

LARVANEM, katerega aktivna snov so infektivne ličinke vrste *Heterorhabditis bacteriophora*. Pripravek je na Nizozemskem registriran za zatiranje rilčkarjev (Curculionidae), kot so ličinke vrste *Otiorynchus sulcatus* F., in za zatiranje ličink vrste *Hepialus lupulinus* L. (Hepialidae);

LARVANEM, katerega aktivna snov predstavljajo infektivne ličinke vrste *Heterorhabditis megidis*. Pripravek je na Nizozemskem registriran za zatiranje rilčkarjev (Curculionidae), kot so ličinke *Otiorynchus sulcatus* F., in za zatiranje vrst iz družine Pseudococcidae (*Planococcus citri* R., *Pseudococcus* spp.);

ENTONEM, katerega aktivna snov so infektivne ličinke vrste *Steinernema feltiae*. Ta pripravek je na Nizozemskem registriran za zatiranje ličink iz rodu *Sciara*, vrste *Bradysia paupera* in za zatiranje bolh (Siphonaptera).

Pripravki so bili med transportom obdani z ledenimi vložki in shranjeni v paketu iz stiroporja, kar je preprečevalo negativen vpliv višje okoljske temperature na ogorčice in morebitne poškodbe med transportom. V vsakem je bilo 50 milijonov ogorčic vsake vrste. To je obenem najmanjša pakirna enota, ki jo podjetje Koppert b.v. pripravlja za trg.

#### 3.2 SHRANJEVANJE OGORČIC

Ogorčice smo shranjevali v hladilniku pri temperaturi od 2 do 4°C. Shranjene so bile v originalni embalaži. Proizvajalec ogorčic v navodilih za njihovo uporabo priporoča porabo celotnega pripravka po odprtju, ker se lahko vitalnost entomopatogenih ogorčic sicer zelo hitro zmanjša. Ker vseh ogorčic nismo porabili naenkrat, smo njihovo vitalnost s standardno metodo preverjali med vsako uporabo.

### 3.3 DOLOČEVANJE KONCENTRACIJE OGORČIC

V stekleno čašo smo dali 0,1 g pripravka, katerega aktivna snov so infektivne ličinke, in dodali 10 ml destilirane vode. Pripravljeno suspenzijo smo za približno 1 uro pustili na sobni temperaturi. Nato smo na parafilm s pipeto nanесли 1  $\mu$ l suspenzije ogorčic in pod svetlobnim mikroskopom prešteli žive infektivne ličinke. To smo ponovili desetkrat in izračunali povprečno število živih infektivnih ličink v 1  $\mu$ l suspenzije. Iz dobljenih podatkov smo izračunali koncentracijo suspenzije. Za želeno koncentracijo ogorčic v obravnavanju smo odmerili potrebno količino suspenzije.

### 3.4 KAPUSOVI BOLHAČI (*Phyllotreta* spp.)

Nabiranje odraslih osebkov (imago) kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) je potekalo na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani. Bolhače smo nalovili na kitajskem kapusu (*Brassica pekinensis*) s pomočjo večjih plastičnih posod, ki smo jih prislonili na liste kitajskega kapusa, jih potresli, da so vanje popadali hroščki. Za celoten poskus smo nalovili 1200 kapusovih bolhačev. Lovljenje žuželk je potekalo v zgodnjih jutranjih urah, ko so bili zaradi nižjih temperatur manj aktivne.

### 3.5 POTEK RAZISKAVE

V entomološkem laboratoriju na Katedri za entomologijo in fitopatologijo smo preučevali učinkovitost štirih vrst entomopatogenih ogorčic, *Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae*, *Heterorhabditis bacteriophora* in *H. megidis*, za zatiranje nadzemskih škodljivcev kapusnic, in sicer odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.).

Aplikacija suspenzije entomopatogenih ogorčic je potekalo z delno spremenjeno metodo Svendsen in Steenberg (2000). Učinkovitost entomopatogenih ogorčic smo preučevali v treh koncentracijah: 200, 1000 in 2000 infektivnih ličink/osebek (IJ/osebek) oziroma 2000, 10000 in 20000 infektivnih ličink v 1 ml destilirane vode na petrijevko. V vsako od petrijevk s premerom 9 cm smo položili majhen list zelja, ki je bil med poskusom hrana kapusovim bolhačem. V petrijevko smo položili še filter papir, na katerega smo nanесли izbrano koncentracijo infektivnih ličink. V vsako petrijevko smo vstavili 5 odraslih osebkov kapusovih bolhačev, jih pokrili z nekoliko širšo s petrijevko, ter ju oblepili z lepilnim trakom, da obravnavane žuželke ne bi pobegnile iz njih. Suspenzije z ogorčicami smo pripravili v steklenih čašah, v vsako petrijevko s kapusovimi bolhači pa smo s pipeto vbrizgali 1 ml tako pripravljene raztopine. Ob dodajanju različnih vrst in koncentracij ogorčic smo na pipetah zamenjali nastavek (tops). Četrto obravnavanje je bila kontrola. Pri tej smo v petrijevke vbrizgali le 1 ml destilirane vode, brez infektivnih ličink.

Petrijevke smo položili v gojitveno komoro tipa RK-900 CH (proizvajalec: Kambič laboratorijska oprema d.o.o., Semič) z delovno kapaciteto 0,868 m<sup>3</sup> (širina x višina x globina = 1000 x 1400 x 620 mm). Vsako obravnavanje je bilo ponovljeno v petkrat.

Učinkovitost ogorčic smo preverjali v temi pri treh različnih temperaturah (15, 20 in 25 °C) in 95 % relativni zračni vlagi. Mrtve osebkke kapusovih bolhačev smo šteli 2, 4, 6 in 8 dni po aplikaciji ogorčic. Novi rod entomopatogenih ogorčic iz rodu *Steinernema* se je v mrtvih hroščkih pojavil po 8 dneh, medtem ko se je novi rod ogorčic iz rodu *Heterorhabditis* pojavil 14 dni po nastavitvi poskusa. Tako smo potrdili, da je bil vzrok smrti kapusovih bolhačev prisotnost entomopatogenih ogorčic.

### 3.6 STATISTIČNA ANALIZA

Rezultate poskusa smo statistično iz vrednotili (analiza variance, primerjava rezultatov povprečij z Duncanovim preizkusom mnogoterih primerjav pri  $P < 0,05$ ) s programom Statgraaphich Plus for Windows 4.0, grafično pa smo jih predstavili s programom MS Office Excel 2003. Odstotek smrtnosti kapusovih bolhačev smo korigirali z uporabo Abbottove formule (Abbott 1925). Za vse vrste entomopatogenih ogorčic smo izračunali vrednosti  $LC_{50}^2$  in  $LC_{90}^3$ .

Abbottova formula:

Korigirana smrtnost % =  $100 * (1 - \frac{\text{število osebkov po tretiranju}}{\text{število osebkov po tretiranju v kontroli}})$

---

<sup>2</sup> Srednja letalna (smrtna) koncentracija, ki povzroči smrt 50 % preučevanih osebkov.

<sup>3</sup> Srednja letalna (smrtna) koncentracija, ki povzroči smrt 90 % preučevanih osebkov.





Slika 5: Lovljenje kapusovih bolhačev na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani  
(foto: M. Jeran)



Slika 6: Kapusov bolhač v petrijevki (foto: M. Jeran)





Slika 7: Kapusovi bolhači v petrijevkah v različnih obravnavanjih (foto: M. Jeran)



Slika 8: Ocenjevanje učinkovitosti entomopatogenih ogorčic v entomološkem laboratoriju na Katedri za entomologijo in fitopatologijo (foto: M. Jeran)





Slika 9: Gojitvena komora tipa RK-900 CH v entomološkem laboratoriju na katedri za Entomologijo in fitopatologijo (foto: M. Jeran)



Slika 10: Entomološki laboratorij na Katedre za entomologijo in fitopatologijo (foto: M. Jeran)



## 4 REZULTATI

### 4.1 SKUPINSKA ANALIZA

Skupinska analiza zbranih rezultatov je pokazala, da so na smrtnost odraslih osebkov statistično značilno vplivali: temperatura, vrsta entomopatogenih ogorčic, koncentracija ogorčic, dnevi po tretiranju, interakcija med temperaturo in koncentracijo suspenzije ogorčic, interakcija med temperaturo in dnevi po tretiranju, interakcija med vrsto entomopatogenih ogorčic in koncentracijo suspenzije ogorčic, interakcija med vrsto entomopatogenih ogorčic in dnevi po tretiranju, interakcija med koncentracijo suspenzije ogorčic in dnevi po tretiranju, interakcija med temperaturo, vrsto entomopatogenih ogorčic in koncentracijo suspenzije ogorčic, interakcija med temperaturo, vrsto entomopatogenih ogorčic in dnevi po tretiranju, interakcija med temperaturo, koncentracijo suspenzije ogorčic in dnevi po tretiranju, interakcija med vrsto entomopatogenih ogorčic, koncentracijo suspenzije ogorčic in dnevi po tretiranju in interakcija med temperaturo, vrsto entomopatogenih ogorčic, koncentracijo suspenzije ogorčic in dnevi po tretiranju.

Ista analiza je pokazala statistično značilno najvišjo smrtnost kapusovih bolhačev pri 25° (42,63±1,69), vrsti *Steinernema feltiae* (41,38±1,93), pri koncentraciji 2000 IJ/osebek (35,28±1,61) in 8 dni po tretiranju (52,01±1,83). Statistično značilna nižja smrtnost je bila ugotovljena pri 15°C (14,15±0,98), ogorčici *Heterorhabditis megidis* (21,04±1,41), pri koncentraciji 200 IJ/osebek (24,31±1,29) in 2 dni po tretiranju (5,50±0,55).

### 4.2 INDIVIDUALNA ANALIZA

Dva dni po tretiranju entomopatogenih ogorčic pri 15°C smo ugotovili statistično značilen vpliv vrste ogorčic na smrtnost kapusovih bolhačev, in sicer pri koncentraciji 200 IJ/osebek in 2000 IJ/osebek, medtem ko pri koncentraciji 1000 IJ/osebek med vrstami ogorčic ni bilo statistično značilnih razlik. Pri 20°C, je imela vrsta ogorčic statistično značilen vpliv pri koncentraciji 200 IJ/osebek, 1000 IJ/osebek in 2000 IJ/osebek. Tudi pri 25°C je vrsta ogorčic signifikantno vplivala na smrtnost imagov kapusovih bolhačev pri vseh treh koncentracijah suspenzije.

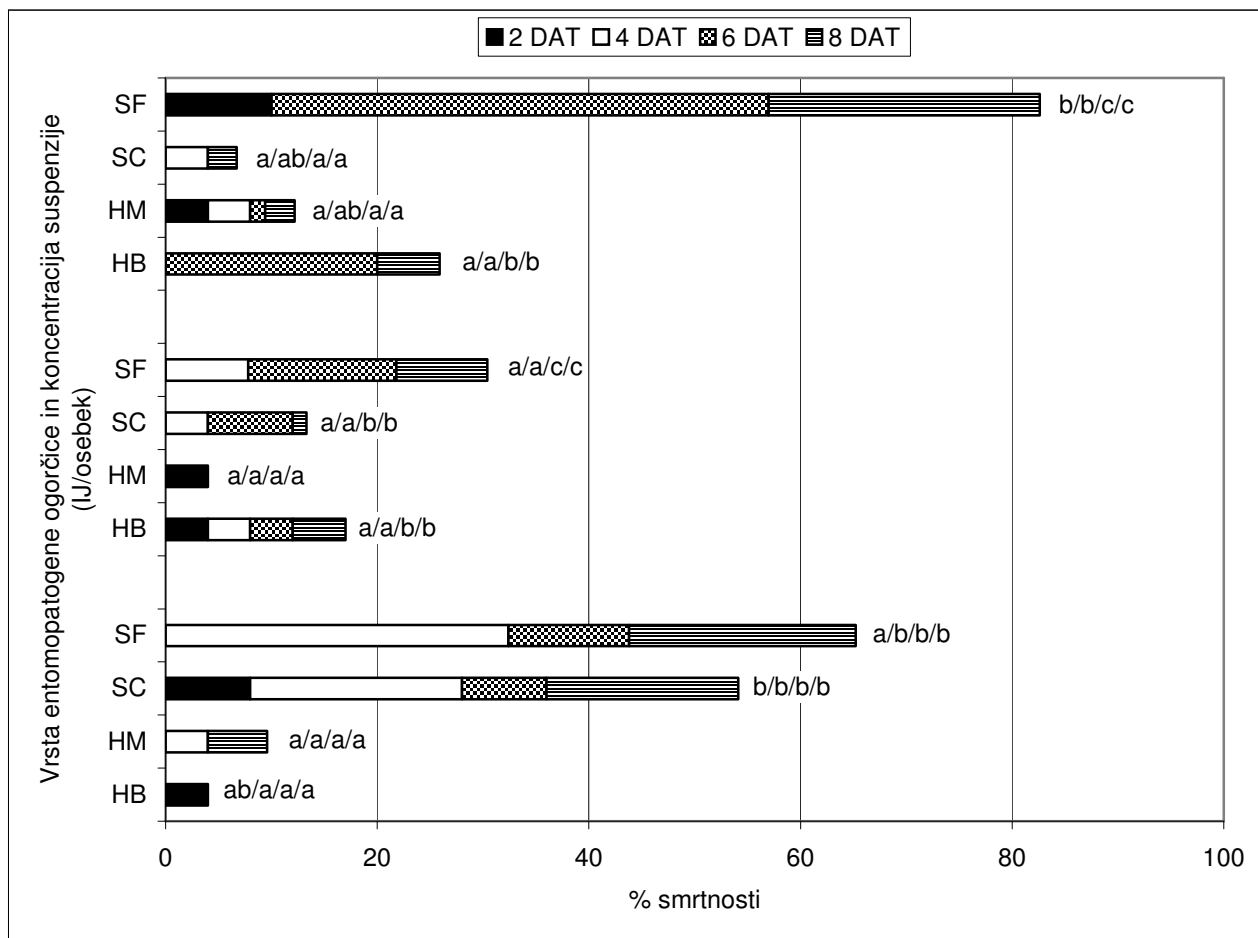
Četri dan po tretiranju ogorčic pri 15°C je imela vrsta ogorčic signifikanten vpliv na smrtnost kapusovih bolhačev pri koncentraciji 200 IJ/osebek in 2000 IJ/osebek, medtem, ko tega nismo zaznali pri koncentraciji 1000 IJ/osebek. Vrsta entomopatogenih ogorčic je tudi statistično značilno vplivala na smrtnost bolhačev pri 20°C, in sicer pri 200 IJ/osebek in pri 2000 IJ/osebek, medtem ko tega nismo zasledili pri koncentraciji 1000 IJ/osebek. Pri 25°C je imela vrsta ogorčic signifikanten vpliv na smrtnost kapusovih bolhačev pri vseh treh koncentracijah.

Šesti dan po tretiranju pri 15°C je vrsta ogorčic statistično značilno vplivala smrtnost kapusovih bolhačev pri vseh treh koncentracijah. Vrsta entomopatogenih ogorčic je imela pri vseh treh koncentracijah statistično značilen vpliv na smrtnost kapusovih bolhačev pri 20°C in tudi pri 25°C.

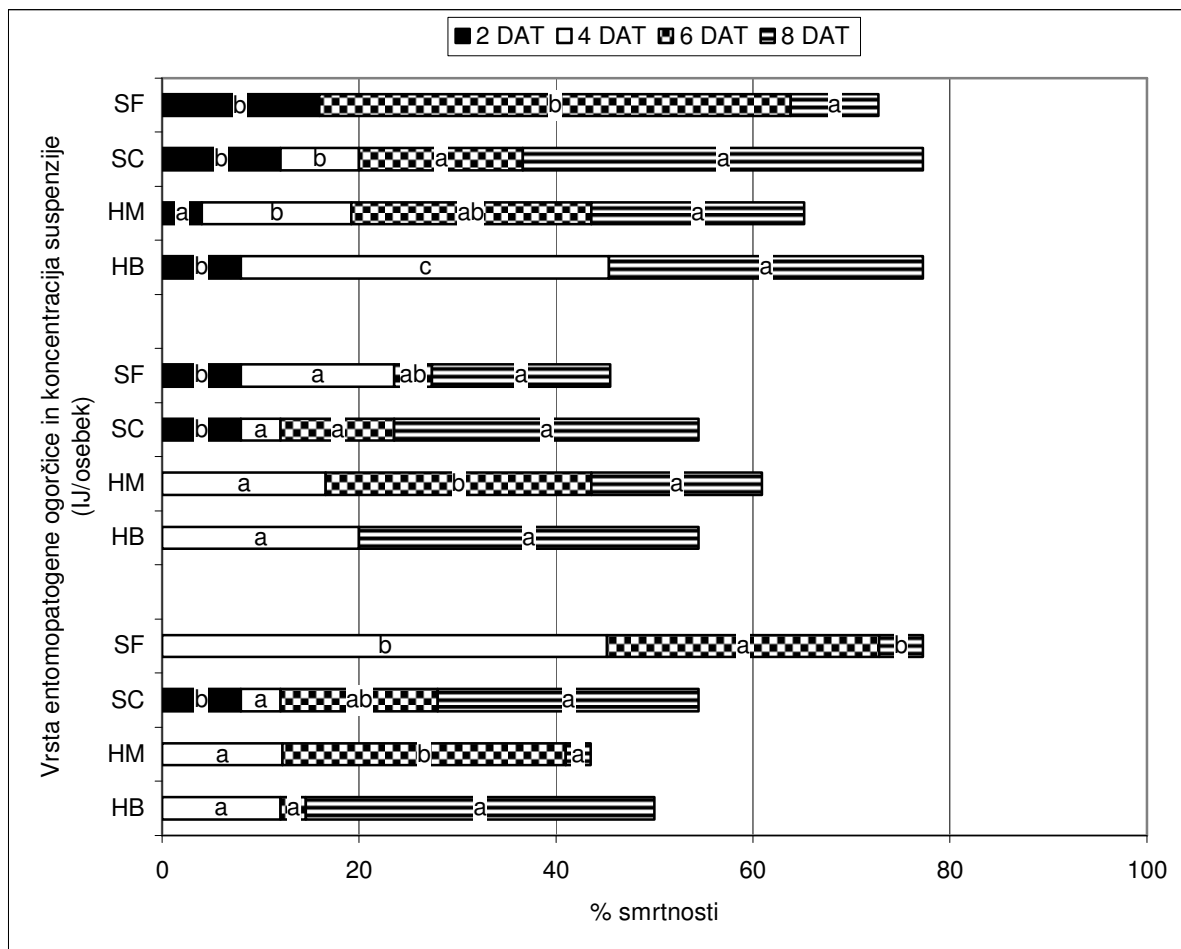
Osmi dan po tretiranju pri 15°C je vrsta ogorčic statistično značilno vplivala na smrtnost kapusovih bolhačev pri vseh treh koncentracijah suspenzije ogorčic. Pri 20°C smo ugotovili statistično značilen vpliv vrste ogorčic na smrtnost bolhačev le pri koncentraciji 200 IJ/osebek, medtem ko tega pri koncentracijah 1000 IJ/osebek in 2000 IJ/osebek nismo zaznali. Pri 25°C smo ugotovili statistično značilen vpliv vrste ogorčic na smrtnost bolhača pri vseh treh koncentracijah.

Obe vrsti entomopatogenih ogorčic iz rodu *Steinernema* sta pokazali zadovoljivo učinkovitost pri 15°C in koncentraciji 200 IJ/osebek osmi dan po tretiranju (približno 60 % smrtnost odraslih osebkov kapusovih bolhačev), medtem, ko sta obe vrsti iz rodu *Heterorhabditis* pokazali nižjo stopnjo učinkovitosti. Vrsta *H. bacteriophora* je bila le okrog 25 % učinkovita pri najvišji koncentraciji (slika 11). Pri isti koncentraciji je bila ogorčica *S. feltiae* najbolj učinkovita in je povzročila več kot 80 % smrtnost bolhačev. Pri 20°C so vse štiri vrste entomopatogenih ogorčic pokazale višjo učinkovitost, tudi najmanj učinkovita med njimi, *H. megidis*, pa je povzročila smrtnost 45 % osebkov pri najnižji koncentraciji (slika 12). Pri koncentraciji 2000 IJ/osebek so vse štiri vrste ogorčic pokazale več kot 65 % učinkovitost, medtem ko se je pri najnižji koncentraciji najbolj izkazala *S. feltiae* (vplivala na 80 % smrtnost kapusovih bolhačev). Na splošno so bile vse štiri vrste entomopatogenih ogorčic najbolj učinkovite pri 25°C, edina izjema je bila, da so bile pri najnižji koncentraciji suspenzije vse štirih ogorčic manj učinkovite kot pri 20°C (slika 13). *H. bacteriophora* pri koncentraciji 2000 IJ/osebek in *S. feltiae* pri 1000 IJ/osebek sta povzročili 100 % smrtnost kapusovih bolhačev.

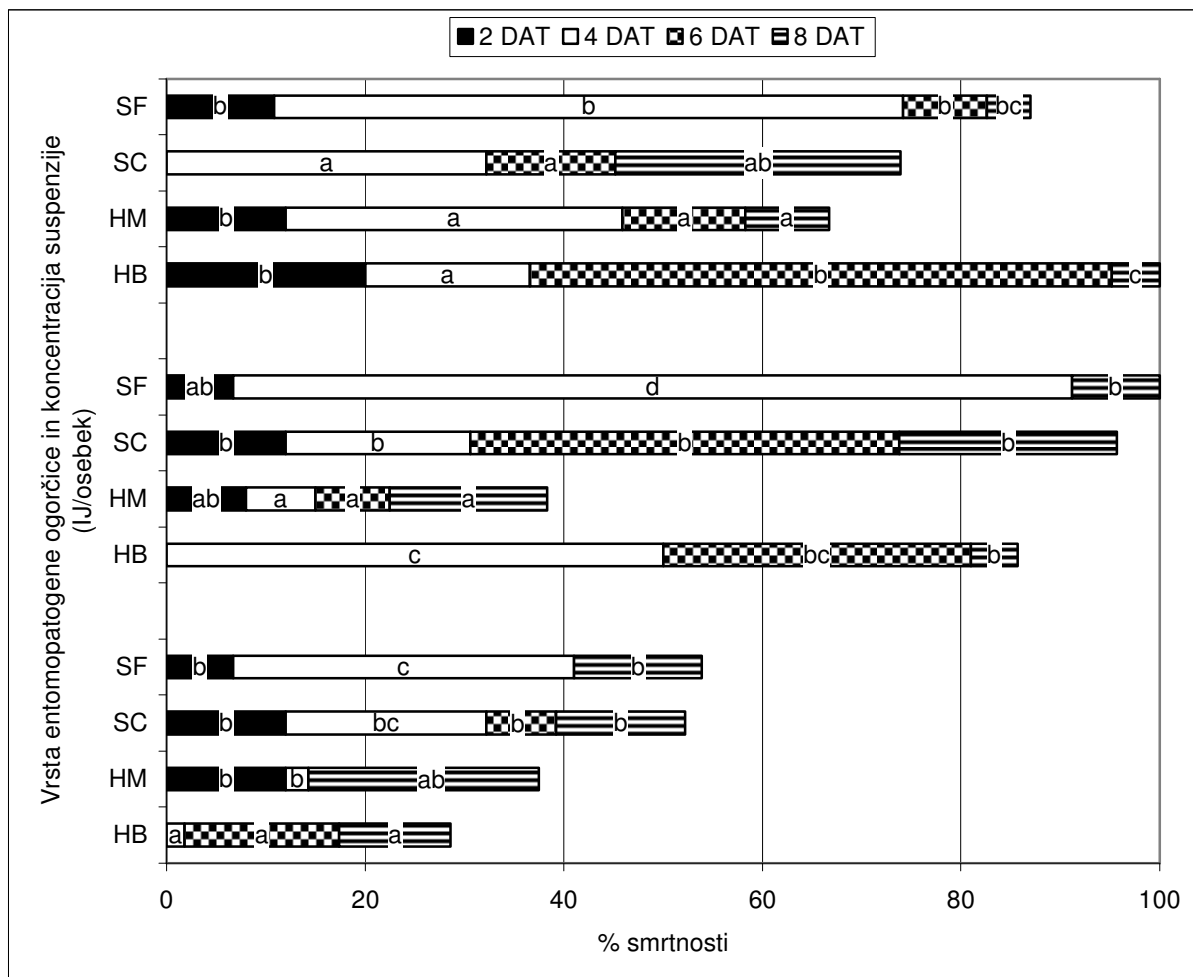
LC<sub>50</sub> in LC<sub>90</sub> vrednosti, izračunane iz rezultatov raziskave, so zbrane v preglednici 2. Pri 15°C je imela najnižje LC vrednosti vrsta *S. feltiae* (LC<sub>50</sub> = 975 IJ/osebek, LC<sub>90</sub> = 1320 IJ/osebek), najvišje pa *H. bacteriophora* (LC<sub>50</sub> = 2492 IJ/osebek, LC<sub>90</sub> = 4089 IJ/osebek). Pri 20°C je imela najnižjo LC<sub>50</sub> vrednost *S. carpocapsae* (752 IJ/osebek), medtem ko je imela *S. feltiae* najnižjo LC<sub>90</sub> vrednost (1097 IJ/osebek). Pri isti temperaturi je imela najvišjo LC<sub>50</sub> vrednost *S. feltiae* (1044 IJ/osebek) in LC<sub>90</sub> vrednost *H. bacteriophor* (1596 IJ/osebek). Pri 25°C se je *S. feltiae* izkazala kot najbolj učinkovita pri delovanju na odrasle osebkove kapusovih bolhačev (LC<sub>50</sub> = 730 IJ/osebek in LC<sub>90</sub> = 1104 IJ/osebek), medtem ko je *H. megidis* pokazala najnižjo učinkovitost (LC<sub>50</sub> = 1148 IJ/osebek, LC<sub>90</sub> = 1588 IJ/osebek).



Slika 11: Smrtnost odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dni po tretiranju s tremi različnimi koncentracijami štirih vrst entomopatogenih ogorčic pri 15 °C. Črke na desni strani stolpcev pomenijo statistično značilne razlike ( $P < 0.05$ , Duncanov preizkus mnogoterih primerjav) v smrtnosti med vrstami ogorčic pri isti koncentraciji in istem dnevu tretiranja. Prikazani podatki so korigirani z Abbottovo formulo. HB- *Heterorhabditis bacteriophora*, HM – *H. megidis*, SC – *Steinernema carpocapsae*, SF- *S. feltiae*.



Slika 12: Smrtnost odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dni po tretiranju s tremi različnimi koncentracijami štirih vrst entomopatogenih ogorčic pri 20 °C. Črke na desni strani stolpcev pomenijo statistično značilne razlike ( $P < 0.05$ , Duncanov preizkus mnogoterih primerjav) v smrtnosti med vrstami ogorčic pri isti koncentraciji in istem dnevu tretiranja. Prikazani podatki so korigirani z Abbottovo formulo. HB- *Heterorhabditis bacteriophora*, HM – *H. megidis*, SC – *Steinernema carpocapsae*, SF- *S. feltiae*.



Slika 13: Smrtnost odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dni po tretiranju s tremi različnimi koncentracijami štirih vrst entomopatogenih ogorčic pri 25 °C. Črke na desni strani stolpcev pomenijo statistično značilne razlike ( $P < 0.05$ , Duncanov preizkus mnogoterih primerjav) v smrtnosti med vrstami ogorčic pri isti koncentraciji in istem dnevu tretiranja. Prikazani podatki so korigirani z Abbottovo formulo. HB- *Heterorhabditis bacteriophora*, HM – *H. megidis*, SC – *Steinernema carpocapsae*, SF- *S. feltiae*.

Preglednica 2: Izračunane vrednosti LC<sub>50</sub> in LC<sub>90</sub> za štiri različne vrste entomopatogenih ogorčic pri treh različnih temperaturah osmi dan po tretiranju

Vrsta ogorčice	LC <sub>50</sub> <sup>z</sup> (95 % IZ <sup>y</sup> )			LC <sub>90</sub> <sup>z</sup> (95 % IZ <sup>y</sup> )		
	15°C	20°C	25°C	15°C	20°C	25°C
<i>S. feltiae</i>	975 (483-1467)	1044 (477-1641)	730 (156-1304)	1320 (659-1980)	1097 (517-1677)	1104 (662-1546)
<i>S. carpocapsae</i>	-	752 (310-1193)	870 (303-1437)	-	1536 (908-2164)	1199 (706-1691)
<i>H. megidis</i>	1354 (0-2963)	1020 (587-1452)	1148 (738-1559)	1629 (0-2963)	1309 (673-1945)	1588 (864-2312)
<i>H. bacteriophora</i>	2494 (1689-3295)	912 (442-1382)	778 (434-1122)	4089 (2475-5703)	1596 (927-2264)	1383 (1035-1732)

<sup>z</sup> LC<sub>50</sub> in LC<sub>90</sub> izražena kot število infektivnih ličink na odrasel osebek.

<sup>y</sup> interval zaupanja (IZ) je napisan v oklepaju

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Rezultati naše raziskave so potrdili znano dejstvo, da so entomopatogene ogorčice v visokih koncentracijah v povezavi z ugodnimi abiotičnimi dejavniki (visoka vlaga, optimalna temperatura) učinkoviti biotični agensi za zatiranje odraslih osebkov iz reda Coleoptera. Dosedanje raziskave so potrdile njihovo učinkovitost pri zatiranju odraslih osebkov hrošča *Popillia japonica* Newman (Lacey in sod., 1993), koruznega hrošča (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) (van der Burgt in sod., 1998), hrošča *Typhaea stercorea* L. (Svendsen in Steenberg, 2000), žuželko *Cosmopolites sordidus* Germar (Cabanillas, 2003), črnega žitnega žužka (*Sitophilus granarius* [L.]) (Trdan in sod., 2006), surinamskega mokaarja (*Oryzaephilus surinamensis* [L.]) (Trdan in sod., 2006) in še na nekaterih drugih predstavnikih iz reda Coleoptera.

Pri 15°C je osmi dan po tretiranju le ogorčica *S. feltiae* zadovoljivo učinkovala na odrasle osebkove kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.). Stopnja smrtnosti hroščkov je pri najnižji koncentraciji suspenzije znašala več kot 60 % oziroma pri najvišji koncentraciji več kot 80 %. V podobni raziskavi (Chen in sod., 2003) je pri najnižji temperature 10°C ogorčica *S. feltiae* edina pokazala učinkovitost na starejše ličinke kapusove muhe (*Delia radicum* [L.]).

Vse štiri vrste entomopatogenih ogorčic so bile bolj učinkovite pri 20°C kot pri 15°C. Osmi dan po tretiranju je bila pri najvišji koncentraciji suspenzije dosežena 65 % smrtnost, pri najnižji koncentraciji pa je le ena vrsta dosegla mejo 60 % učinkovitosti. Pri 20°C je bila najmanj učinkovita ogorčica *Heterorhabditis megidis*, ki je vplivala na okrog 45 % smrtnosti odraslih osebkov kapusovih bolhačev.

Za večino entomopatogenih ogorčic je bila koncentraciji 2000 IJ/osebek bolj kot pri 20°C ustrezna temperature pri 25°C. Po drugi strani pa je bila temperatura 20°C bolj ustrezna za ogorčice pri nižjih koncentracijah. V sorodni raziskavi sta Svendsen in Steenberg (2000) dokazala, da je za zatiranje škodljivca *Typhaea stercorea* najbolj uspešna ogorčica *S. carpocapsae*. Po štirih dneh od nastavitve poskusa je bila pri koncentraciji 1000 IJ/osebek smrtnost omenjenega škodljivca 97 % (LD<sub>50</sub> = 67 IJ/osebek). Podobno je naši raziskavi na kapusove bolhače po enakem času delovala ogorčica *S. feltiae*, medtem ko je *S. carpocapsae* isto stopnjo smrtnosti dosegla šele osmi dan po tretiranju. Pri analizi rezultatov smo ugotovili, da je bila pri 25°C, štiri dni po aplikaciji pri obeh najvišjih koncentracijah dosežena 75 % smrtnosti osebkov kapusovih bolhačev. Ogorčica *H. megidis* je dosegla podobno stopnjo učinkovitosti pri isti koncentraciji po 6 dneh.

Temperatura med 20 in 26°C je znana kot najbolj ustrezna za učinkovito delovanje entomopatogenih ogorčic, vendar pa obstajajo razlike med temperaturo, vrstami žrtev in vrsto biotičnih agensov. Surinamski mokaar je bil najbolj občutljiv na napad entomopatogenih ogorčic pri 20°C sedem dni po tretiranju z ogorčico *S. carpocapsae* (LD<sub>50</sub> = 921 IJ/osebek). Po istem času je bila pri vseh štirih obravnavanih ogorčicah ugotovljena največja učinkovitost pri 25°C (LD<sub>50</sub> = 505-1175 IJ/osebek) (Trdan in sod.,

2006). Na podlagi rezultatov raziskav lahko zaključimo, da je optimalna temperatura za delovanje entomopatogenih ogorčic v omenjenem temperaturnem intervalu (Doucet in sod., 1996).

Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da je aktivnost entomopatogenih ogorčic v večji meri odvisna od temperature kot od koncentracije. Ena od novejših raziskav potrjuje to hipotezo, vendar pa z večjo stopnjo zanesljivosti to hipotezo potrdimo z dejstvom o vrstni specifičnosti gostitelja in ogorčice (Arthus in sod., 2004). Manjši pomen koncentracije ogorčic lahko razložimo z dejstvom, da je število infektivnih ličink entomopatogenih ogorčic regulirano z infektivnimi ličinkami, ki so že prej bile v gostitelju (Bednarek in Nowicki, 1986). Dejstvo, da koncentracija ogorčic nima tako velikega vpliva na smrtnost gostitelja, predstavlja prednost v biotičnem varstvu rastlin z entomopatogenimi ogorčicami, saj potencialni uporabniki teh agensov za primerljivo učinkovitost lahko kupujejo manjšo količino pripravkov. Strategija varstva rastlin z entomopatogenimi ogorčicami ima v primerjavi s konvencionalnim pristopom (kemičnimi pripravki) tudi svoje pomankljivosti (Reibnitz in von Backhaus, 1994; Goude in Shapiro-Ilan, 2003), kljub temu, da so entomopatogene ogorčice znane kot izjemno varni biotični agensi (Ehlers, 2003). Zadovoljivo učinkovitost entomopatogenih ogorčic pri nižjih temperaturah je v našem poskusu pri 15°C pokazala vrsta *S. feltiae*, kar je iz praktičnega vidika (tretiranje v oblačnem vremenu ali ponoči) (Akalach in Wright, 1995) zagotovo prednost. Tako lahko sklepamo, da bi bila uporaba ogorčic v našem okolju ustrezna nekje med 8°C, ki pri nas v nočnih urah nastopijo v maju ter 15°C, kolikor znaša povprečna julijska temperatura (Agencija za okolje Republike Slovenije, 2006)

V prihodnje bo uporaba entomopatogenih ogorčic za zatiranje kapusovih bolhačev in drugih pri nas škodljivih žuželk, v veliki meri odvisna od tega ali bodo ogorčice še vedno imele status eksotičnih agensov. Vendar pa je glede na dejstvo, da so te ogorčice našli že v večini evropskih držav, kot tudi nekaterih naših sosednjih državah (Hominick, 2002), le še vprašanje časa, kdaj jih bomo odkrili tudi v Sloveniji. Tako se bo lahko uporaba ogorčic v namene biotičnega varstva rastlin pred škodljivci iz laboratorijev prenesla tudi na prosto. Zavedati pa se seveda moramo, da učinkovitost, dosežena v laboratorijskih raziskavah ni primerljiva s tisto na prostem.



## 6 POVZETEK

Kapusovi bolhači (*Phyllotreta* spp.) so v Sloveniji in v številnih evropskih državah pomembni škodljivci kapusnic. Pridelovalci kapusnic zato za varstvo rastlin pred kapusovimi bolhači uporabljajo insekticide. Pretiravanje z njihovo rabo lahko vpliva na pojav odpornosti omenjenih škodljivcev kot tudi škodljivcev na takšne insekticide. Uporabniki insekticidov so velikokrat mnenja, da je vzrok neučinkovitosti pripravkov posledica v njihovi premajhni koncentraciji. Zato povečajo odmerek, posledice pa se nemalokrat kažejo v fitotoksičnosti. Prav zato iščejo raziskovalci širom sveta nove pristope v varstvu rastlin pred škodljivimi organizmi. Med njimi je tudi biotično varstvo rastlin z entomopatogenimi ogorčicami.

Entomopatogene ogorčice imajo dobre lastnosti za učinkovito biotično varstvo rastlin, saj nimajo negativnih vplivov na okolje, lahko jih uporabljamo na vodovarstvenih omočjih, imajo veliko gostiteljev med rastlinskimi škodljivci, se enostavno razmnožujejo, so komercialno dostopne v tujini, niso fitotoksične in lahko gostitelja oslabijo ali ubijejo že v 48 urah po infekciji. V nekaterih primerih se lahko entomopatogene ogorčice uporabljajo skupaj z insekticidi, ne da bi bila zmanjšana učinkovitost ogorčic. Entomopatogene ogorčice se lahko na rastline nanšajo s škropilnicami, ki so namenjene za fitofarmaceutska sredstva ali opremo za gnojenje.

V naši raziskavi smo ugotavljali vpliv pomembnejših okoljskih dejavnikov na učinkovitost štirih vrst entomopatogenih ogorčic – *Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae*, *Heterorhabditis bacteriophora* in *H. megidis* – za zatiranje odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.). Njihovo učinkovitost za zatiranje teh nadzemskih škodljivcev kapusnic smo ugotavljali pri različnem številu infektivnih ličink v suspenziji, s katero smo tretirali škodljivca (0 - kontrola, 1000, 5000 in 10000 ogorčic/ml destilirane vode). Učinkovitost ogorčic smo ugotavljali pri različnih temperaturah (15, 20 in 25°C) in pri stalni relativni zračni vlagi (95 %). Razmerje med svetlobo in temo v gojitveni komori je bilo 0:24. Razlog takšnega razmerja med omenjenima dejavnikoma je v dejstvu, da so ogorčice občutljive na ultravijolično sevanje in je njihova učinkovitost večja ponoči in oblačnem vremenu.

S preučevanjem hkratnega delovanja večjega števila abiotičnih (okoljski parametri) in biotičnih dejavnikov (koncentracija ogorčic v suspenziji) smo pridobili pomembne in doslej še malo znane podatke o učinkovitosti obravnavanih vrst entomopatogenih ogorčic za zatiranje izbranega škodljivca. Ogorčice *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, *Heterorhabditis bacteriophora* in *H. megidis* smo za namen naše raziskave dobili v biopripravkih podjetja Koopert iz Nizozemske.

Odrasle osebkke kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) smo nabrali na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani. Za celoten poskus smo ulovili 1200 imagov. Lovili smo jih v zgodnjih jutranjih urah, ko so bili, zaradi nižjih temperatur, manj aktivni.

Laboratorijski poskus smo izvajali v steklenih petrijevkah, v katere smo položili filter papir. Nanj smo nanесли izbrano koncentracijo suspenzije ogorčic (ali le destilirano vodo v kontrolnem obravnavanju), dodali del zeljnega lista, ki je bil dopolnilna hrana za bolhače ter v vsako od petrijev dali 5 odraslih osebke kapusovih bolhačev. Vsako obravnavanje (nič - kontrola, 200, 1000 in 2000 infektivnih ličink (IJ/osebke) je bilo petkrat ponovljeno pri vsaki temperaturi (15, 20 in 25°C). Petrijevke smo nato pokrili z drugimi, širšimi, ter jih zlepili z lepilnim trakom, da smo preprečili pobeg bolhačev. Petrijevke smo položili v gojitveno komoro z vnaprej nastavljenimi parametri vlažnosti (95 %), razmerjem med svetlobo in temo ter izbrano temperaturo.

Dobljene rezultate smo statistično ovrednotili (analiza variance, primerjava rezultatov povprečij z Duncanovim preizkusom mnogoterih primerjav pri  $P < 0,05$  s programom Statgraphichs Plus for Windows 4.0). Smrtnost hroščkov smo korigirali z Abbottovo formulo.

Vse štiri vrste entomopatogenih ogorčic so bile uspešne pri delovanju na preučevanega škodljivca, ugotovili pa smo, da obstajajo razlike v njihovi učinkovitosti za zatiranje kapusovih bolhačev. Na učinkovitost zatiranja škodljivca so vplivali različni dejavniki, kot so temperatura okolja, koncentracija suspenzije ogorčic, vrsta ogorčic kot tudi interakcija med vsemi naštetimi dejavniki. Na učinkovitost delovanja ogorčic je vplival tudi čas (dnevi po tretiranju); rezultate smo namreč vrednotili 2., 4., 6. in 8. dan po nastavitvi poskusa.

Pri najnižji temperaturi je bila zadovoljivo učinkovita le ogorčica *Steinernema feltiae*, ki je pri najnižji koncentraciji povzročila 60 % smrtnost osebke, pri najvišji koncentraciji pa več kot 80 %. Vse štiri vrste entomopatogenih ogorčic so bile bolj učinkovite pri 20 kot pri 15°C. Osmi dan po tretiranju je bila le pri najvišji koncentraciji suspenzije dosežena 65 % smrtnost hroščkov, pri najnižji koncentraciji pa je le ena vrsta dosegla mejo 60 % učinkovitosti. Pri 20°C je bila najmanj učinkovita ogorčica *Heterorhabditis megidis*, ki je dosegla le okrog 45 % smrtnost odraslih osebke kapusovih bolhačev.

Za večino entomopatogenih ogorčic je bila pri koncentraciji 2000 IJ/osebke bolj kot 20 ustrežna temperatura 25°C. Po drugi strani pa je bila temperatura 20°C bolj ustrežna za ogorčice pri nižjih koncentracijah suspenzije. Z analizo rezultatov smo ugotovili, da je pri 25°C četrti dan po tretiranju pri obeh najvišjih koncentracijah pri ogorčici *S. feltiae* dosežena 75 % smrtnost osebke kapusovih bolhačev. Ogorčica *Heterorhabditis megidis* je dosegla podobno stopnjo učinkovitosti pri isti koncentraciji suspenzije po 6 dneh.

Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da je aktivnost entomopatogenih ogorčic v večji meri odvisna od temperature kot od koncentracije suspenzije. Dejstvo, da koncentracija ogorčic nima tako velikega vpliva na smrtnost gostitelja, predstavlja prednost v biotičnem varstvu rastlin s pomočjo entomopatogenih ogorčic. Iz našega poskusa lahko sklepamo, da bi bila uporaba ogorčic v našem okolju ustrezna nekje med 8°C, ki pri nas v nočnih urah nastopijo v maju ter 15°C, katere so v nočnih urah julija (Agencija za okolje Republike Slovenije, 2006).

V prihodnje bo uporaba entomopatogenih ogorčic za zatiranje kapusovih bolhačev in drugih pri nas škodljivih žuželk, v veliki meri odvisna od tega ali bodo ogorčice še vedno imele status tujerodnih organozmov (eksotičnih agensov). Vendar pa je glede na dejstvo, da so te ogorčice našli že v večini evropskih držav, kot tudi nekaterih naših sosednjih državah (Hominick, 2002), le še vprašanje časa, kdaj jih bomo odkrili tudi v Sloveniji. Tako se bo lahko uporaba ogorčic v namene biotičnega varstva rastlin pred škodljivci iz laboratorijev prenesla tudi na prosto. Zavedati pa se seveda moramo, da učinkovitost, dosežena v laboratorijskih raziskavah ni primerljiva s tisto na prostem.

## 7 VIRI

- Abbott W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economical Entomology*, 18: 265-267.
- Agencija za okolje in prostor RS. 2006-08-21  
<http://www.arso.gov.si>
- Akalach M., Wright D.J. 1995. Control of the larvae of *Conorhynchus mendicus* (Col.:Curculionidae) by *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae* (Nematoda, Steinernematidae) in the Gharb area (Morocco). *Entomophaga*, 40: 321-327.
- Akhurst R.J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoalectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology*, 121, 303-309.
- Arthurs S., Heinz K.M., Prasifka J.R. 2004. An analysis of using entomopathogenic nematodes against above-ground pests. *Buletin of Entomology Research*, 94: 297-306.
- Bedding R., Akhurst R., Kaya H. 1993. Nematodes and the biological control of insect Pests. CSIRO Publications, East Melbourne, Australia.
- Bednarek A., Nowicki T. 1986. Effect of intrapopulation factors in the nematodes *Steinernema feltiae* (Steinernematidae) on the intensity of insect infestation. *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych*, 323: 199-212.
- Belair G., Fournier Y., Dauphinais N. 2003. Efficacy of steinernematid nematodes against three insect pests of crucifers in Quebec. *Journal of Nematology*, 35, 259-265.
- Burnell A.M., Dowds C.A. 1996. The genetic improvement of entomopathogenic nematodes and their symbiont bacteria: Phenotypic targets, genetic limitations and an assessment of possible hazards. *Biocontrol Science and Tecnology*, 6, 435-447.
- Burnell A.M., Stock S.P. 2000. Heterorhabditis, Steinernema and their bacterial symbionts – lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2 (1): 31-42.
- Chen S., Li J., Han X., Moens M. 2003. Effect of temperature on the pathogenicity of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.) to *Delia radicum*. *Biological Control*, 48: 713-724.
- Clarke D.J., Dowds B.C.A. 1991. Pathogenicity of *Xenorhabdus luminescens*. *Biochemical Society Transactions*, 20: 65-78.

- Clarke D.J., Dowds B.C.A. 1995. Virulence mechanisms of *Photorhabdus* sp. strain K122 towards wax moth larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66:149 – 155.
- Doucet M.M.A., de Miranda M.B., Bertolotti M.A., Caro K.A. 1996. Efficacy of *Heterorhabditis bacteriophora* (strain OLI) in relation to temperature, concentration and origin of the infective juvenile. *Nematophila*, 26, 129-133.
- Ehlers R.U. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 5-6, 623-633.
- Gaugler R. 1999. Matching nematodes and insect to achieve optimal field performance. V: Optimal use of insectidal nematodes in pest management. Paravarapu S. (ed). New Jersey, Bluberry Cranberry Research and Extension Center: 9-14.
- Gaugler R., Kaya H.K. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Florida, Boca Raton, CRC Press: 365 str.
- Gaugler R. 2002. Entomopathogenic Nematology. New Jersey, CABI Publishing: 373 str.
- Gaugler R., Fraley R.T. 1989. Genetic selection for host-finding in *Steinernema feltiae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54: 363 – 372.
- Glazer I., Gaugler R., Segal D. 1991. Genetics of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88: the diversity of beneficial traits. *Journal of Nematology*, 23: 324 – 333.
- Goude D.H., Shapiro-Ilan D.I. 2003. Case studies in cotton and citrus: use of entomopathogenic nematodes. *Indian Journal of Nematology*, 33: 91-102.
- Grewal P.S. 1998. Formulation of entomopathogenic nematodes for storage and application. *Japanese Journal of Nematology*, 28: 68-74.
- Grewal P.S. 2000a. Enhanced ambient storage stability of an entomopathogenic nematode through anhydrobiosis. *Pest Manegment Science*, 56: 401-406.
- Grewal P.S. 2000b. Anhydrobiotic potencial and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). *International Journal for Parasitology*, 30: 995-1000.
- Grewal P.S. 2002. Formulation and application technology. V: Entomopathogenic nematology. Gaugler R. 2002 (ed.). Ohio: 265-287.

- Grewal P.S. 1999b. Insecticidal Nematode Laboratory. V: Optimal use of insectidal nematodes in pest management. Poravarapu S. (ed.). New Jersey, Bluberry Cranberry Research and Extension Center: 51-61.
- Hashmi S., Hashmi G., Gaugler R. 1995. Genetic transformation of an entomopathogenic nematode by microinjection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 13: 411 – 415.
- Hazir S., Kaya H.K., Stock S.P., Keskin N. 2003. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology*, 27: 181-202.
- Hominick W.M. 2002. Biogeography. In: Entomopathogenic nematology. CABI Wallingford, Publishing: 115-143.
- Kamionek M., Pezowicz E., Weclawska G. 1997. The effect of ecological conditions on the behaviour of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) in the soil environmental. *Animal Science*, 33: 3-13.
- Kaya H.K. 2000. Entomopathogenic nematodes and their prospects for biological control in California. V: California conference on biological control. Hoddle M.S. (ed). Riverside, California: 38-46.
- Kaya K.H. 2002. Natural enemies of entomopathogenic nematodes. V: Entomopathogenic nematology. Gaugler R. (ed). Oxon, CAB International: 189-203.
- Kaya K.H., Koppenhöfer A.M. 1999. Biology and ecology of insectidal nematodes. V: Optimal use of insectidal nematodes in pest management. Poravarapu S. (ed). New Jersey, Bluberry Cranberry Research and Extension Center: 1-8.
- Kaya H.K., Burlando T.M., Thurston G.S. 1993. Two entomopathogenic nematode species with different search strategies for insect suppression. *Environmental Entomology*, 22: 859-864.
- Kaya K.H., Koppenhöfer A.M., Johnson M. 1998. Natural enemies of entomopathogenic nematodes. *Japanese Journal of Nematology*, 28 Special Issue: 13-21.
- Khuong- Nguyen, B. 2002. Entomopathogenic Nematodes. Entomology and Nematology Department (31. jan. 2006)  
<http://kbn.ifas.ufl.edu/kbnstein.htm> (15.8.2006)
- Koppenhöfer A.M. 2000. Nematodes. V: Field manual of techniques in invertebrate pathology. Kaya H.K. (ed.). The Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 283-301.

- Koppenhöfer A.M., Kaya H.K. 2002. Entomopathogenic nematodes and insect pest management. *Microbial-biopesticides*, 15: 277-305.
- Krasomil – Osterfeld K., Ehlers R. U. 1994. Influence of environmental factors on phase variation in *Photorhabdus luminescens*. Proceedings of the Sixth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Society for Invertebrate Pathology, Montpellier 1: 101-106.
- Lacey L.A., Bettencourt R., Gaugler R.H. 1993. Factors influencing parasitism of adult Japanese beetles, *Popillia japonica* (Col.: Scarabaeidae) by entomopathogenic nematodes. *Entomophaga*, 38: 501-509.
- Lewis E.E. 2000. Biology, selection, handling and application of entomopathogenic nematodes. V: Proceedings of Beneficial nematode workshop. Gothro P. (ed.). Oregon: 7-10.
- Milevoj L. 2002. Biotično varstvo solatnic. *Sodobno kmetijstvo*, 33, 6: 282-283.
- O'Leary S., Power A.P., Stack C.M., Burnell A.M. 2001. Behavioural and physiological responses on infective juveniles of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* to desiccation. *BioControl*, 46: 345-362.
- O'Leary S.A., Stack C.M., Chubb M.A., Burnell A.M. 1998. The effect of day of emergence from the insect cadaver on the behavior and environmental tolerances of infective juveniles of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* (Strain UK211). *The Journal of Parasitology*, 84, 4: 665-672.
- Peters A. 1996a. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. And Their impact on insect populations. *Biocontrol Science and Technology*, 6:389-402.
- Peters A. 1996b. Host finding by the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. V: Insect pathogens and insect parasitic nematodes. Proceedings of the first joint meeting. *Bulletin-OILB-SROP*, 19, 9: 99-102.
- Peters A., Ehlers R.U. 1994. Susceptibility of leatherjackets (*Tipula paludosa* and *Tipula oleracea*; Tipulidae; Nematocera) to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 63: 163-171.
- Shapiro I.,Gaugler R. 2002. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28: 137-146.

- Smart G.C. Jr. 1995. Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. *Journal of Nematology*, 27, 4: 529-534.
- Smith K. 1999. Factors affecting efficacy. V: Optimal use of insectidal nematodes in pest management. Poravarapu S. (ed.). New Jersey, Bluberry Cranberry Research and Extension Center: 37-46.
- Stackebrandt E., Ehlers R.U., Rainey F.A. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: are they sister genera or are their members phylogenetically intertwined? *Symbiosis*, 22: 59-65.
- Svendsen T.S., Steenberg T. 2000. The potential use of entomopathogenic nematodes against *Typhaea stercorea*. *Biocontrol*, 45: 97-111.
- Syvanen M. 1994. Horizontal gene transfer: evidence and possible consequences. *Annual Review of Genetics*, 28: 237 – 261.
- Tiedje J. M. 1989. The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology*, 70: 298 – 315.
- Trdan, S., Vidrih M., Valič N. 2006. Activity of four entomopathogenic nematode species against young adults of *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) under laboratory conditions. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113: 168-173.
- von Reibnitz C., Backhaus G.F. 1994. Investigations on demand for biological control of *Otiiorhynchus* spp. and cost structure of production methods for entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis*). *Gartenbauwissenschaft*, 59: 199-206.
- Vrabl S. 1992. Škodljivci poljščin. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 142 str.
- Westerman P.R. 1994. An essay on assays, in *Genetics of Entomopathogenic nematode – bacterium complexes*, European Commission Publication EUR, 15681 EN: 129 – 142.



## **ZAHVALA**

Ob zaključku diplomske naloge bi se za vsestransko pomoč iskreno zahvalil svojemu mentorju doc. dr. Stanislavu Trdanu, ki mi je stal ob strani tudi takrat, ko je bil sam prezaposlen s svojim delom. Hvala!

Zahvaljujem se tudi strokovnim sodelavcem Katedre za entomologijo in fitopatologijo za pomoč in nasvete, kot tudi za priskrbo z materialom, potrebnim za raziskavo ter vsem ostalim, ki so mi kakorkoli pomagali pri omenjeni nalogi. Hvala vsem, ki ste me spodbujali in mi vlivali samozavest takrat, ko sem jo najbolj potreboval.

Posebna zahvala pa gre tudi žal pokojnemu prof. Zdravku Kegleviču, ki me je na gimnaziji Vič poučeval biologijo ter me tudi navdušil nad naravoslovjem. Kot eden od redkih profesorjev je verjel vame in v moje sposobnosti. Zdravko, res je tako kot si rekel: »Vsak si sam piše svojo zgodbo življenja, potrjujejo pa te le dejstva!« Hvala ti!

## PRILOGA

Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) pri 15°C

Priloga A1: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Steinernema carpocapsae*

	Obravnavanje	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Skupaj
		1	2	3	4	5	
2. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	0	1	0	0	1	2
	5000 ogorčic/ml	0	0	0	0	0	0
	10000 ogorčic/ml	0	0	0	0	0	0
	Obravnavanje	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Skupaj
		1	2	3	4	5	
4. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	0	2	1	1	3	7
	5000 ogorčic/ml	0	0	0	1	0	1
	10000 ogorčic/ml	1	0	0	0	0	1
	Obravnavanje	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Skupaj
		1	2	3	4	5	
6. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	1	2	2	1	3	9
	5000 ogorčic/ml	1	1	0	1	0	3
	10000 ogorčic/ml	1	0	0	0	0	1
	Obravnavanje	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Skupaj
		1	2	3	4	5	
8. DAN	Kontrola	0	0	0	1	0	1
	1000 ogorčic/ml	1	4	4	2	3	14
	5000 ogorčic/ml	1	1	1	1	0	4
	10000 ogorčic/ml	1	0	0	0	0	1

Priloga A2: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Steinernema feltiae*

	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
2. DAN	Kontrola	1	1	0	0	0	2
	1000 ogorčic/ml	0	0	0	0	0	0
	5000 ogorčic/ml	0	0	0	0	0	0
	10000 ogorčic/ml	0	1	1	0	1	3
	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
4. DAN	Kontrola	1	1	0	0	0	2
	1000 ogorčic/ml	2	0	2	2	3	9
	5000 ogorčic/ml	1	1	1	0	0	3
	10000 ogorčic/ml	3	3	3	3	3	15
	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
6. DAN	Kontrola	1	1	0	0	0	2
	1000 ogorčic/ml	3	1	2	3	3	12
	5000 ogorčic/ml	2	1	1	2	1	7
	10000 ogorčic/ml	3	3	3	3	3	15
	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
8. DAN	Kontrola	1	1	0	0	0	2
	1000 ogorčic/ml	5	2	4	3	3	17
	5000 ogorčic/ml	2	2	1	2	2	9
	10000 ogorčic/ml	5	5	4	3	4	21

Priloga A3: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Heterorhabditis bacteriophora*

	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
2. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	0	1	0	0	0	1
	5000 ogorčic/ml	1	0	0	0	0	1
	10000 ogorčic/ml	0	0	0	0	0	0
4. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	0	1	0	0	0	1
	5000 ogorčic/ml	1	1	0	0	0	2
	10000 ogorčic/ml	0	0	0	0	0	0
6. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	0	1	0	0	0	1
	5000 ogorčic/ml	1	1	0	0	1	3
	10000 ogorčic/ml	1	0	1	2	1	5
8. DAN	Kontrola	0	0	0	1	0	1
	1000 ogorčic/ml	0	1	0	0	0	1
	5000 ogorčic/ml	1	1	1	1	1	5
	10000 ogorčic/ml	2	0	2	2	1	7

Priloga A4: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Heterorhabditis megidis*

	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
2. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	0	0	0	0	0	0
	5000 ogorčic/ml	0	0	1	0	0	1
	10000 ogorčic/ml	1	0	0	0	0	1
4. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	0	0	1	0	0	1
	5000 ogorčic/ml	0	0	1	0	1	2
	10000 ogorčic/ml	1	0	1	0	0	2
6. DAN	Kontrola	1	1	0	0	0	2
	1000 ogorčic/ml	0	0	1	0	0	1
	5000 ogorčic/ml	0	0	1	0	1	2
	10000 ogorčic/ml	1	0	1	0	1	3
8. DAN	Kontrola	1	1	0	0	0	2
	1000 ogorčic/ml	0	2	1	0	0	3
	5000 ogorčic/ml	0	0	1	0	1	2
	10000 ogorčic/ml	1	0	1	0	2	3

PRILOGA B

Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) pri 20°C.

Priloga B1: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Steinernema carpocapsae*

	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
2. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	0	1	0	0	1	2
	5000 ogorčic/ml	1	0	0	1	0	2
	10000 ogorčic/ml	0	0	1	2	0	3
4. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	1	2	0	0	1	4
	5000 ogorčic/ml	1	0	0	1	1	3
	10000 ogorčic/ml	0	0	3	2	0	5
6. DAN	Kontrola	1	1	0	0	0	2
	1000 ogorčic/ml	2	3	1	0	2	8
	5000 ogorčic/ml	1	1	0	3	2	7
	10000 ogorčic/ml	2	1	4	3	0	10
8. DAN	Kontrola	1	1	0	0	1	3
	1000 ogorčic/ml	3	4	1	4	3	15
	5000 ogorčic/ml	3	3	3	3	3	15
	10000 ogorčic/ml	4	4	5	4	3	20

Priloga B2: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Steinernema feltiae*

	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
2. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	0	0	0	0	0	0
	5000 ogorčic/ml	0	0	0	0	2	2
	10000 ogorčic/ml	1	1	2	0	0	4
	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
4. DAN	Kontrola	1	0	0	0	1	2
	1000 ogorčic/ml	3	4	2	3	0	12
	5000 ogorčic/ml	1	2	0	1	3	7
	10000 ogorčic/ml	2	2	3	2	2	11
	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
6. DAN	Kontrola	1	1	1	0	0	3
	1000 ogorčic/ml	4	5	3	5	2	19
	5000 ogorčic/ml	2	2	1	1	3	9
	10000 ogorčic/ml	3	3	4	5	2	17
	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
8. DAN	Kontrola	1	1	1	0	0	3
	1000 ogorčic/ml	4	5	4	5	2	20
	5000 ogorčic/ml	2	2	3	1	5	13
	10000 ogorčic/ml	3	4	5	5	2	19

Priloga B3: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Heterorhabditis bacteriophora*

	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
2. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	0	0	0	0	0	0
	5000 ogorčic/ml	0	0	0	0	0	0
	10000 ogorčic/ml	0	0	2	0	0	2
4. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	0	0	1	1	1	3
	5000 ogorčic/ml	0	0	2	2	1	5
	10000 ogorčic/ml	4	2	3	2	1	12
6. DAN	Kontrola	0	0	0	0	1	1
	1000 ogorčic/ml	0	0	1	1	3	5
	5000 ogorčic/ml	1	0	2	2	1	6
	10000 ogorčic/ml	4	2	3	2	2	13
8. DAN	Kontrola	0	0	0	0	1	1
	1000 ogorčic/ml	2	2	2	4	4	14
	5000 ogorčic/ml	3	4	2	3	3	15
	10000 ogorčic/ml	4	4	3	4	5	20



Priloga B4: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Heterorhabditis megidis*

	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
2. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	0	0	0	0	0	0
	5000 ogorčic/ml	0	0	0	0	0	0
	10000 ogorčic/ml	0	1	0	0	0	1
4. DAN	Kontrola	1	1	0	0	0	2
	1000 ogorčic/ml	1	1	0	2	0	4
	5000 ogorčic/ml	1	2	0	2	0	5
	10000 ogorčic/ml	0	1	1	2	2	6
6. DAN	Kontrola	1	1	0	0	0	2
	1000 ogorčic/ml	3	3	0	4	1	11
	5000 ogorčic/ml	2	5	2	2	1	12
	10000 ogorčic/ml	2	3	1	4	2	12
8. DAN	Kontrola	1	1	0	0	0	2
	1000 ogorčic/ml	3	3	1	4	1	12
	5000 ogorčic/ml	3	5	5	2	1	16
	10000 ogorčic/ml	2	3	3	4	5	17

## PRILOGA C

Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) pri 25°C.

Priloga C1: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Steinernema carpocapsae*

	Obravnavanje	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Skupaj
		1	2	3	4	5	
2. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	0	1	1	0	1	3
	5000 ogorčic/ml	1	0	2	0	0	3
	10000 ogorčic/ml	0	0	0	0	0	0
	Obravnavanje	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Skupaj
		1	2	3	4	5	
4. DAN	Kontrola	0	0	1	0	1	2
	1000 ogorčic/ml	0	1	2	2	4	9
	5000 ogorčic/ml	1	2	2	2	2	9
	10000 ogorčic/ml	0	1	3	1	4	9
	Obravnavanje	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Skupaj
		1	2	3	4	5	
6. DAN	Kontrola	0	0	1	0	1	2
	1000 ogorčic/ml	1	1	3	2	4	11
	5000 ogorčic/ml	4	3	4	4	4	19
	10000 ogorčic/ml	0	2	4	2	4	12
	Obravnavanje	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Ponovitev	Skupaj
		1	2	3	4	5	
8. DAN	Kontrola	0	0	1	0	1	2
	1000 ogorčic/ml	2	2	4	2	4	14
	5000 ogorčic/ml	5	5	5	4	5	24
	10000 ogorčic/ml	3	5	5	2	4	19

Priloga C2: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Steinernema feltiae*

	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
2. DAN	Kontrola	1	0	0	0	0	1
	1000 ogorčic/ml	0	1	1	0	0	2
	5000 ogorčic/ml	0	0	0	1	1	2
	10000 ogorčic/ml	2	0	0	1	0	3
	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
4. DAN	Kontrola	1	0	0	0	0	1
	1000 ogorčic/ml	3	3	4	0	1	11
	5000 ogorčic/ml	3	5	4	4	5	21
	10000 ogorčic/ml	5	5	3	3	3	19
	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
6. DAN	Kontrola	1	0	0	0	0	1
	1000 ogorčic/ml	3	3	4	0	1	11
	5000 ogorčic/ml	4	5	5	4	5	23
	10000 ogorčic/ml	5	5	4	4	3	21
	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
8. DAN	Kontrola	1	0	0	0	0	1
	1000 ogorčic/ml	5	3	4	0	2	14
	5000 ogorčic/ml	5	5	5	5	5	25
	10000 ogorčic/ml	5	5	5	4	3	22

Priloga C3: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Heterorhabditis bacteriophora*

	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
2. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	0	0	0	0	0	0
	5000 ogorčic/ml	0	0	0	0	0	0
	10000 ogorčic/ml	1	0	2	1	1	5
	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
4. DAN	Kontrola	0	0	1	1	1	3
	1000 ogorčic/ml	0	0	1	0	0	1
	5000 ogorčic/ml	2	1	4	3	4	14
	10000 ogorčic/ml	3	2	3	1	2	11
	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
6. DAN	Kontrola	1	0	1	1	1	4
	1000 ogorčic/ml	2	2	2	0	0	6
	5000 ogorčic/ml	4	2	5	5	5	21
	10000 ogorčic/ml	5	4	5	5	5	24
	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
8. DAN	Kontrola	1	0	1	1	1	4
	1000 ogorčic/ml	2	4	2	1	1	10
	5000 ogorčic/ml	5	2	5	5	5	22
	10000 ogorčic/ml	5	5	5	5	5	25

Priloga C4: Število mrtvih odraslih osebkov kapusovih bolhačev (*Phyllotreta* spp.) 2, 4, 6 in 8 dan po tretiranju z različnimi koncentracijami suspenzije ogorčic *Heterorhabditis megidis*

	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
2. DAN	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1000 ogorčic/ml	1	0	0	1	1	3
	5000 ogorčic/ml	1	0	0	0	1	2
	10000 ogorčic/ml	0	1	0	1	1	3
	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
4. DAN	Kontrola	0	0	1	0	0	1
	1000 ogorčic/ml	2	0	0	1	1	4
	5000 ogorčic/ml	1	0	0	2	2	5
	10000 ogorčic/ml	2	4	1	4	1	12
	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
6. DAN	Kontrola	0	0	1	0	0	1
	1000 ogorčic/ml	2	0	0	1	1	4
	5000 ogorčic/ml	1	0	2	2	2	7
	10000 ogorčic/ml	2	5	2	4	2	15
	Obravnavanje	Ponovitev					Skupaj
		1	2	3	4	5	
8. DAN	Kontrola	0	0	1	0	0	1
	1000 ogorčic/ml	3	1	2	1	3	10
	5000 ogorčic/ml	1	0	2	3	4	10
	10000 ogorčic/ml	4	5	2	4	2	17

