

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Daša MESEC

**UČINEK FLUROKLORIDONA IN METRIBUZINA
NA RAST IN RAZVOJ ENTOMOPATOGENE GLIVE
Beauveria bassiana (Bals.-Criv.) Vuill.**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Daša MESEC

**UČINEK FLUROKLORIDONA IN METRIBUZINA NA RAST IN
RAZVOJ ENTOMOPATOGENE GLIVE *Beauveria bassiana* (Bals.-
Criv.) Vuill.**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF FLUROCHLORIDONE AND METRIBUZIN ON
GROWTH AND DEVELOPMENT OF THE ENTOMOPATHOGENIC
FUNGUS *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija kmetijstva - agronomija. Opravljeno je bilo v fitopatološkem laboratoriju na Katedri za fitomedicino, kmetijsko tehniko, poljedelstvo, pašništvo in travništvo na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Franci Aco CELARJA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc BATIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Franci Aco CELAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Darja KOCJAN AČKO
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Daša Mesec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA

ŠD	Dn
DK	UDK 632.937: 632.95.024.13: 632.952 (043.2)
KG	entomopatogena gliva/flurokloridon/metribuzin/herbicidi/ <i>Bauveria bassiana</i>
KK	AGRIS H01/H60
AV	MESEC, Daša
SA	CELAR, Franci Aco (mentor)
KZ	SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2012
IN	UČINEK FLUROKLORIDONA IN METRIBUZINA NA RAST IN RAZVOJ ENTOMOPATOGENE GLIVE <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	VIII, 27, [1] str., 3 pregl., 16 sl., 34 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Entomopatogena gliva <i>Beauveria bassiana</i> je ena pomembnejših koristnih gliv v tleh. V laboratorijskih razmerah smo z našo raziskavo želeli ugotoviti vpliv dveh herbicidov Sencor WG 70 (metribuzin) in Racer 25 – EC (flurokloridon) na rast micelija entomopatogene glive. Glivo smo gojili na PDA gojišču z dodatkom posameznega herbicida v različnih koncentracijah (100, 75, 50, 25 in 0 % priporočenega poljskega odmerka) in pri dveh različnih temperaturah (15 °C in 5 °C). Inkubacija je potekala štirinajst dni. V tem času smo opazovali rast in razvoj glive ter meritve primerjali z rastjo v kontroli (gojišče brez herbicida). Sencor WG 70 (metribuzin) pri vseh koncentracijah statistično značilno zavira rast micelija, medtem ko Racer 25 – EC (flurokloridon) popolnoma zavre rast pri 100, 75, in 50 % koncentraciji, šibka rast je opazna šele pri 25 % odmerku.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 632.937: 632.95.024.13: 632.952 (043.2)

CX entomopathogenic fungus/flurochloridone/metribuzin/herbicides/*Bauveria bassiana*

CC AGRIS H01/H60

AU MESEC, Daša

AA CELAR, Franci Aco (supervisor)

PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy

PY 2012

TI EFFECT OF FLUROCHLORIDONE AND METRIBUZIN ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.

DT Graduation Thesis (University studies)

NO VIII, 27, [1] p., 3 tab., 16 fig., 34 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* is one of the most important beneficial soil fungi. In laboratory conditions we wanted to determine the effect of two herbicides; Sencor WG 70 (metribuzin) and Racer 25 – EC (flurochloridone), on the mycelial growth of *Beauveria bassiana in vitro*. The fungus was cultured on PDA medium containing an active substance at different concentrations (100, 75, 50, 25 and 0 % of recommended field application concentration) and at two different temperatures (15 °C and 25 °C) for fourteen days. Growth and development of fungi was measured and the data were compared with the growth in control (nutrient medium without herbicide). All concentrations of Sencor WG 70 (metribuzin) statistically inhibited the mycelial growth, meanwhile Racer 25 – EC (flurochloridone) caused total growth inhibition at concentrations 100, 75 and 50 %, and only at 25 % of field concentration a slight mycelial growth was detected.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VI
	KAZALO SLIK	VII
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1	UVOD	1
1.1	VZROK ZA RAZISKAVO	1
1.2	NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	1
2	PREGLED OBJAV	2
2.1	ENTOMOPATOGENE GLIVE	2
2.1.1	Sistematika	2
2.1.2	<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	3
2.2	HERBICIDI	4
2.2.1	Herbicidne aktivne snovi in gliva <i>Beauveria bassiana</i>	5
2.2.2	Metribuzin	7
2.2.3	Flurokloridon	8
3	MATERIAL IN METODE DE LA	9
3.1	POTEK RAZISKAVE	9
3.2	UČINEK HERBICIDOV NA RAST MICELIJA GLIVE	10
3.3	MERITVE IN OBDELAVA PODATKOV	11
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	13
5	POVZETEK IN SKLEPI	24
6	VIRI	26
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Osnovni podatki o FFS, ki smo jih uporabili v laboratorijskem poskusu	9
Preglednica 2:	Povprečna površina in inhibicija rasti micelija glive <i>B. bassiana</i> pri dveh pripravkih v različnih odmerkih po 7 in 14 dneh pri temperaturi 15 °C	13
Preglednica 3:	Povprečna površina in inhibicija rasti micelija glive <i>B. bassiana</i> pri dveh pripravkih v različnih odmerkih po 7 in 14 dneh pri temperaturi 25 °C	17

KAZALO SLIK

Slika 1:	Ličinkavrsti <i>Spodoptera frugiperda</i> okužena z glivo <i>Beauveria bassiana</i> (Hongo entomopatógeno afectando ..., 2010)	3
Slika 2:	Kemijska formula metribuzina (Metribuzin, 2011)	7
Slika 3:	Kemijska formula flurokloridona (Flurochloridone, 2011)	8
Slika 4:	Sterilizirane plastične petrijevke (D. Mesec, 2011)	10
Slika 5:	Brezprašna komora (D. Mesec, 2011)	10
Slika 6:	Gojitvena komora (D. Mesec, 2011)	11
Slika 7:	Primerjava inhibicij rasti micelija glive <i>B. bassiana</i> pri dveh herbicidih v različnih odmerkih po 7 dneh pri temperaturi 15 °C (različne črke pomenijo statistično značilne razlike v prirastih micelija pri različnih koncentracijah znotraj enega pripravka; navaden tisk Sencor, krepek tisk Racer)	14
Slika 8:	Primerjava inhibicij rasti micelija glive <i>B. bassiana</i> pri dveh herbicidih v različnih odmerkih po 14 dneh pri temperaturi 15 °C (različne črke pomenijo statistično značilne razlike v prirastih micelija pri različnih koncentracijah znotraj enega pripravka; navaden tisk Sencor, krepek tisk Racer)	14
Slika 9:	Primerjava prirasta micelija glive <i>Beauveria bassiana</i> v petrijevkah brez dodanega metribuzina (levo) in v petrijevkah s 75 % poljskega odmerka metribuzina (desno) pri temperaturi 15 °C in 60 % r.z.v.	16
Slika 10:	Primerjava prirasta micelija glive <i>Beauveria bassiana</i> v petrijevkah brez dodanega flurokloridona (levo) in v petrijevkah s 75 % poljskega odmerka flurokloridona (desno) pri temperaturi 15 °C in 60 % r.z.v.	16
Slika 11:	Primerjava inhibicij rasti micelija glive <i>B. bassiana</i> pri dveh herbicidih v različnih odmerkih po 7 dneh pri temperaturi 25 °C (različne črke pomenijo statistično značilne razlike v prirastih micelija pri različnih koncentracijah znotraj enega pripravka; navaden tisk Sencor, krepek tisk Racer)	18
Slika 12:	Primerjava inhibicij rasti micelija glive <i>B. bassiana</i> pri dveh herbicidih v različnih odmerkih po 14 dneh pri temperaturi 25 °C (različne črke pomenijo statistično značilne razlike v prirastih micelija pri različnih koncentracijah znotraj enega pripravka; navaden tisk Sencor, krepek tisk Racer)	19

- Slika 13: Primerjava prirasta micelija glive *B. bassiana* v kontrolnih petrijevkah (levo) in v petrijevkah s 50 % poljskim odmerkom flurokloridona (desno) pri temperaturi 25 °C in 60 % r.z.v. 20
- Slika 14: Primerjava prirasta micelija glive *B. Bassiana* v kontrolnih petrijevkah (levo) in v petrijevkah s 50 % poljskim odmerkom metribuzina (desno) pri temperaturi 25 °C in 60 % r.z.v.. 20
- Slika 15: Povprečne inhibicije rasti micelija glive *B. bassiana* po 7 dneh pri različnih odmerkih herbicidov, dveh različnih temperaturah (15 °C in 25 °C) in 60 % r.z.v. 21
- Slika 16: Povprečne inhibicije rasti micelija glive *B. bassiana* po 14 dneh pri različnih odmerkih herbicidov, dveh različnih temperaturah (15 °C in 25 °C) in 60 % r.z.v. 21

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

(Bals.-Criv.) Vuill. – (Balsamo-Crivelli) Vuillemin

PDA – krompirjev dekstrozni agar

IOBC – International Organisation for Biological and Integrated Control of Noxious
Animals and Plants

1 UVOD

Preizkušanje stranskih učinkov fitofarmacevtskih sredstev (FFS) in ostalih kemičnih pripravkov na koristne organizme je v Evropi vedno bolj pomembno in se upošteva tudi pri nadaljnjem razvoju aktivnih snovi.

Biotično varstvo rastlin je način obvladovanja škodljivih organizmov v kmetijstvu in gozdarstvu, ki uporablja žive naravne sovražnike, antagoniste ali kompetitorje ali njihove produkte in druge organizme, ki se morejo sami razmnoževati. Ta način varstva je zasnovan na patologiji žuželk in drugih fitofagnih organizmov, na primer ogorčic, pršic, mehkužcev, vretenčarjev (FITO-INFO, 2011).

Pri uporabi biotičnih pripravkov se moramo zavedati, da gre za živa bitja, na katera zelo vplivajo okoljski dejavniki. Le ti poleg časa in načina uporabe vplivajo na njihovo rast, razvoj in virulentnost ter posledično na njihovo učinkovitost (Celar in sod., 2011).

Entomopatogene glive so pomemben ekološki dejavnik, saj vplivajo na raznolikost in tudi številčnost populacije žuželk ter so pomemben člen v kroženju hranil. Imajo različno široko gostiteljsko območje in različno infektivno dozo. Nekatere med njimi uporabljamo za zatiranje škodljivcev gospodarsko pomembnih rastlin. Entomopatogene glive izločajo množico sekundarnih metabolitov z relativno majhno molekulsko maso, med njimi nekateri delujejo antibiotično, drugi pa vplivajo na patogenezo gliv.

Beauveria bassiana je gliva, ki raste naravno v tleh po vsem svetu. Pripada skupini entomopatogenih gliv, katerih učinkovitost se kaže proti velikemu številu različnih škodljivcev, kot so termiti, resarji, listne uši, razni hrošči, in drugi (Lacey in sod., 2001).

Agrokemikalije, vključno s herbicidi, so pogosto uporabljene v integriranem varstvu rastlin. Redna uporaba ima posledice, predvsem številne lahko negativno učinkujejo na entomopatogene glive. Znanje o združljivosti med glivo *B. bassiana* in običajno uporabljenimi herbicidi je ključnega pomena, da izberemo pripravek in s tem zmanjšamo škodljiv vpliv na učinkovitost glive *Beauveria bassiana*.

1.1 VZROK ZA RAZISKAVO

Nekateri talni herbicidi negativno/pozitivno vplivajo na rast in razvoj talne mikroflore oziroma na entomopatogene glive. Predvidevali smo, da bomo z raziskavo ugotovili, kateri izmed preučevanih registriranih herbicidov ima manj stranskih učinkov na entomopatogeno glivo *Beauveria bassiana*.

1.2 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Cilj diplomskega dela je bil ugotoviti učinek metribuzina in fluorokloridona, ki sta aktivni snovi talnih herbicidov, na rast in razvoj entomopatogene glive *Beauveria bassiana*, pri različnih temperaturah in različnih odmerkih herbicidov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ENTOMOPATOGENE GLIVE

2.1.1 Sistematika

Entomopatogene glive so polifiletska skupina in se nahajajo v dveh kraljestvih: Chromista (Stramenopila) in Fungi (Eumycota). Najdemo jih v vseh taksonih, razen v deblu Basidiomycota (Roberts in Hajek, 1992).

Znanih je več kot 750 vrst, ki so uvrščene v več kot 100 rodov. Največ entomopatogenih gliv pripada kraljestvu Fungi, debloma Ascomycota in Zygomycota (Ihara, 2007).

Deblo Oomycota (kraljestvo Chromista), za katerega je značilen cenocitičen micelij, celulozna celična stena in biflagelatne zoospore. Zajema le nekaj entomopatogenih gliv, ki spadajo v rodova *Lagenidium* (Lagenidiales) in *Leptolegia* (Saprolegniales). Le-te okužujejo večinoma ličinke komarjev in nekaj drugih dvokrilcev (Glare in Milner, 1991).

V deblo Zygomycota spada red Entomophthorales, v katerega so uvrščene izključno entomopatogene glive (približno 200 vrst). Za te glive je med drugim značilna tvorba balistospor (izjema je le rod *Massospora*). V red Mucorales je tudi uvrščenih nekaj entomopatogenih gliv, ki so večinoma oportunisti (Glare in Milner, 1991).

V skupino Deuteromycetes uvrščamo glive, ki so tekom evolucije izgubile teleomorfno obliko ali pa teleomorf še ni bil odkrit. Sem je uvrščenih 40 rodov entomopatogenih gliv, med drugim tudi tiste, ki se najpogosteje pojavljajo: *Aschesonia*, *Beauveria*, *Culicinomyces*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomurea*, *Tolypocladium* in *Lecanicillium* (Glare in Milner, 1991). Za določene vrste iz rodu *Beauveria* so že odkrili teleomorfno obliko, ki ustreza rodu *Cordyceps* (deblo Ascomycota).

Za deblo Ascomycota je značilen septiran haploiden micelij in tvorba največkrat osmih askospor (mejospor) v askih, ki se združujejo v trosišča imenovana askom. Večina entomopatogenih vrst (čez 300) spada v rod *Cordyceps* (Clavicipitales). V red Clavicipitales sodi tudi rod entomopatogenih gliv *Ascosphaera*, ki za razliko od ostalih izvrši okužbo v črevesju gostitelja (Glare in Milner, 1991).

2.1.2 *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.

Vrsta je dobila ime po italijanskem entomologu Agostinu Bassiju, ki je glivo odkril leta 1835 kot vzrok bolezni "muscardine" na udomačenih sviloprejkah. Zelo značilne in opazne bele mumije prizadetih žuželk, so bile povod za ime "muscardine".

Beauveria bassiana je talna gliva in jo najdemo po vsem svetu. Okužuje široko paleto ličink kot tudi odraslih osebkov žuželk, kot so termiti, resarji, listne uši, hrošči, in drugi. Obstaja veliko različnih sevov te glive, ki pa kažejo tudi na velike razlike v obsegu virulence, patogenosti in gostiteljev (Lacey in sod., 2001).

Beauveria bassiana tvori spore, ki so odporne na okoljske dejavnike. Spore imenovane konidiji, so enocelične, haploidne in hidrofobne. Okužujejo žuželke neposredno preko kože. Če sta temperatura in vlaga ugodni, konidiji na povrhnjici gostitelja kalijo. Glivne hife, ki zrastejo iz kalečih spor izločajo encime, ki razgradijo povrhnjico gostitelja in tako omogočijo glivi, da prodre v notranjost žuželke. V telesu gostitelja gliva tvori toksin imenovan beauvericin, ki oslabi imunski sistem gostitelja. Ko gostitelj pogine, začne gliva tvoriti antibiotik oosperin, ki ji omogoča, da izpodrine črevesne bakterije. Sčasoma je celotno telo znotraj gostitelja napolnjeno z micelijem. Ko so okoljske razmere ugodne, gliva izraste skozi mehkejša dele telesa žuželke navzven in sporulira. Da se gliva *Beauveria bassiana* razvije na površju žuželk, mora biti relativna zračna vlažnost vsaj 92 % ali več (Mahr, 1997).



Slika 1: Ličinka vrste *Spodoptera frugiperda* okužena z glivo *Beauveria bassiana* (Hongo ..., 2010)

2.2 HERBICIDI

Poglavje je povzeto po viru Lešnik (2007).

Pripravke, ki spadajo v skupino herbicidov, uporabljamo za uničevanje neželenih rastlin, to so rastline, ki v določenem trenutku uspevajo na nekem rastišču (njiva, nasad, travnik in pašnik), njihov razvoj pa ni skladen s cilji pridelave tam rastočih gojenih rastlin. Z njimi želimo zatreti predvsem na kopnem rastoče plevelne enoletnice in večletnice (trave, zeli, grmovja, drevesa), včasih pa tudi vodne rastline in alge.

Plevel je rastlina, ki uspeva med gojenimi rastlinami in z njimi tekmuje za vire, kot so hrana, voda, prostor in svetloba. Brez zatiranja plevela se lahko količina pridelka zmanjša za 40 - 100 %. To je odvisno od tekmovalne sposobnosti gojenih rastlin, sestave flore plevelov in zapleveljenosti (pokrovnosti). Pleveli lahko z zagotavljanjem zavetja škodljivcem in boleznim povzročijo tudi druge težave, ki vplivajo na količino in kakovost pridelka. Za učinkovito in donosno kmetijsko pridelavo je nujno potrebno ustrezno zatiranje plevelov.

Manj pogoste rabe herbicidov so za uničevanje plevelov v bližini prometnih povezav (ceste, železnice, letališča). Številne prednosti uporabe herbicidov, kot so višji pridelki, manjši vpliv bolezni in insektov, boljša izraba vode in druge, opravičujejo uporabo le teh. Predvsem pa mora vsak uporabnik paziti na pravilno rabo herbicidov in s tem v največji meri preprečiti škodljive vplive na okolje in hkrati tudi na človeka. Herbicidi imajo širok razpon strupenosti.

Redna uporaba širokega spektra FFS, vključno s herbicidi, s svojim kopičenjem v tleh in okolju vplivajo na biološko komponento in nekatere povezave v verigi medsebojnih biocenoznih odnosov. Poudarek na vlogi naravnih sovražnikov je eden od ključnih pristopov celostnega zatiranja škodljivcev. Večina naravnih sovražnikov pa je občutljivih na kemične pripravke za varstvo rastlin.

Razvoj herbicidov je usmerjen ne le v iskanje aktivne snovi z izraženim delovanjem na ciljno skupino plevelov, ampak predvsem v smeri ohranjanja okolja. Skratka, herbicid mora ne le zanesljivo delovati, ampak mora imeti tudi natančno določene ekotoksikološke lastnosti, ki jih predpisuje zakonodaja. Zato morajo pridelovalci kemikalije uporabiti na strokovno najustreznejši način in hkrati izbrati vse druge možne oblike nekemičnega zatiranja plevelov oz. neželenih rastlin (biotično, mehansko, fizikalno, ... zatiranje).

2.2.1 Herbicidne aktivne snovi in gliva *Beauveria bassiana*

Fitofarmacevtska sredstva, vključno s herbicidi, se v kmetijstvu pogosto uporabljajo v programih integriranega pridelovanja. Redna uporaba širokega spektra herbicidov lahko povzroči nalaganje in kopičenje aktivnih snovi v tleh, kar pa ima določen vpliv na talno mikro- in makrofloro.

Večina aktivnih učinkovin v FFS je biotično močno aktivnih. Aktivne snovi običajno v svoji izhodiščni obliki sploh niso uporabne ali pa jih v praktičnih razmerah sploh ne bi mogli odmerjati. Spraviti jih moramo v uporabno obliko, čemur pravimo formuliranje. Aktivni snovi dodajamo razne (neaktivne) snovi, kot so nosilci, topila, emulgatorji, močila in barve (Celar, 2006).

Kmetijstvo se vse bolj usmerja v integrirano pridelovanje poljščin. Tu se izvaja varstvo rastlin, ki vključuje vse ekološko, ekonomsko in toksikološko sprejemljive načine za zadrževanje škodljivih organizmov pod pragom gospodarske škode. Pomembna sestavina integriranega varstva je biotično varstvo rastlin (Milevoj, 2007).

Večina naravnih sovražnikov, kamor uvrščamo tudi entomopatogene glive, je občutljivih na kemijske pripravke. Pomanjkanje pesticidne odpornosti teh organizmov biotičnega varstva, je torej velika ovira za povečanje njihove vloge in učinkovitosti v programih integriranega varstva. Zato so nujno potrebni selektivni pesticidi, ki ne bi imeli škodljivega vpliva na naravne sovražnike (Poprawski in Majchrowcz, 1995).

Znanje o združljivosti med glivo *B. bassiana* in običajno uporabljenimi herbicidi v posevku je ključnega pomena. Zaviralni učinki herbicidov na procese talnih gliv se razlikujejo glede na glivne vrste in njihove seve, pa tudi glede količine nakopičenih herbicidov v tleh.

Opazovanja in raziskave so pokazale, da imata sočasna uporaba glive *B. bassiana* in herbicidne aktivne snovi dikvat sinergijski učinek¹ na smrtnost insektov, medtem ko je druga aktivna snov glufosinat-amonij škodljiva in nezdružljiva z glivo *B. bassiana*. Herbicidi navadno spremenijo gostiteljevo (rastlinsko) obrambo, povečajo izločanje njihovih izcedkov in nabiranje tekočin, ter hkrati zmanjšajo rast patogenov. Pretekle študije so tudi pokazale, da so z apliciranjem herbicidov v tla inhibirane entomopatogene glive in ovirane tudi naravne epizootije². Entomopatogena gliva *Beauveria bassiana* je zelo občutljiva na do sedaj preizkušene herbicide, tako pri običajnem kot povečanem poljskem odmerku (Ambethgar in sod., 2009).

Fungicidni učinki glifosata in glifosatnih formulacij na entomopatogeno glivo *B. bassiana* so bili ocenjeni v laboratorijskih razmerah. Delovanje je bilo določeno z merjenjem zaviranja rasti micelija v tleh. Glifosat kot aktivna snov ni imel nobenega negativnega delovanja na glivo *Beauveria bassiana*, medtem ko so imele formulacije glifosata

¹ Sinergija je sodelovanje, medsebojno dopolnjevanje dveh ali več snovi/organizmov, ki ustvarijo večji učinek, kot bi ga ustvarili, če bi delovali posamezno (SSKJ, 2008).

² Epizootija je nenaden izbruh in hitro širjenje kake nalezljive bolezni pri živalih (SSKJ, 2008).

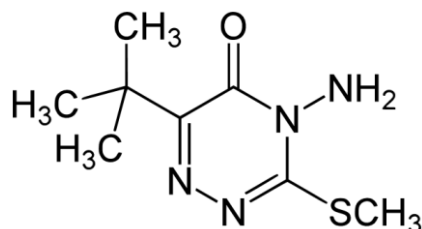
sinergijski učinek. Rezultati so torej pokazali, da je gliva *Beauveria bassiana* dovzetna tudi za različne formulacije pripravka, na samo aktivno snov pa ne (Morjan in sod., 2002).

Na splošno na glivo *Beauveria bassiana* vpliva veliko FFS, predvsem fungicidi in herbicidi in ne toliko insekticidi. Prav tako je gliva inkompatibilna z rastnimi regulatorji oziroma hormoni, zato se je potrebno izogibati kombinacije škropilne brozge pakrobutrazola, flurprimidola in silaida z glivo *Beauveria bassiana*. Mefluidid je edini rastni regulator, ki je v raziskavah le malo ali nič inhibiral kalivost in rast entomopatogene glive *Beauveria bassiana*. Aplikacija z rastnimi hormoni ali drugimi FFS ima torej fungicidne lastnosti, ki jih je potrebno skrbno spremljati, zato da bi se izognili motnjam ali epizootijam glive *Beauveria bassiana* (Storey in Gardner, 1986).

Testiranje vplivov oziroma stranskih učinkov FFS na koristnih organizmih je postalo obvezen del zahtevane dokumentacije za registracijo pripravkov v več evropskih državah. To pa je za razvoj mednarodno priznanih smernic še toliko bolj pomembno. Med več kot 100 preizkušenimi pesticidi jih je le nekaj, ki so relativno majhne toksičnosti in/ali imajo omejeno obstojnost na preizkušenih naravnih organizmih. Ta testiranja ne služijo samo temu, da se pridobijo informacije o stranskih učinkih FFS na koristne organizme, pač pa dajejo tudi priložnost za izboljšanje tehnik testiranja, primerjavo rezultatov in izmenjavo izkušenj (Sterk in sod., 1999).

2.2.2 Metribuzin

Poglavje je povzeto s spletne strani PPDB – Pesticide Properties Data Base, University of Hertfordshire (2011).



Aktivna snov metribuzin (slika 2) sodi v kemijsko skupino 1,2,4-triazinonov. So heterociklične spojine s tremi ogljikovimi atomi in tremi dušikovimi.

Slika 2: Kemijska formula metribuzina
(Metribuzin, 2011)

Metribuzin je aktivna snov selektivnih sistemičnih herbicidov, ki se absorbira prvenstveno prek korenin, vendar lahko tudi prek listja. Translocira se akropetalno in inhibira fotosintezo. Učinkovit je proti številnim semenskim širokolistnim, pa tudi nekaterim travnim plevelom. Njegova selektivnost se kaže v krompirju, soji, starejših posevkih, lucerni, na sadikah paradižnika.

Pri FFS nas zanimata dva podatka, in sicer razgradnja v tleh (DT_{50}) in stopnja razgradnje v vodnih sistemih oz. podtalnici.

DT_{50} je čas izražen v dnevih, ki je potreben, da se koncentracija pesticida v tleh v aerobnih pogojih zmanjša za 50 % od dneva aplikacije. Glede na trajanje oziroma obstojnost pripravka je razdeljen je v 4 skupine: < 30 = ni perzistentno, $30 - 100$ = zmerno perzistentno, $100 - 365$ = perzistentno, > 365 = zelo perzistentno. Predvidena razpolovna doba herbicida Sencor WG 70 (metribuzin) v tleh je 11,5 dni, dejanska razpolovna doba pa je 19 dni (ni perzistentno).

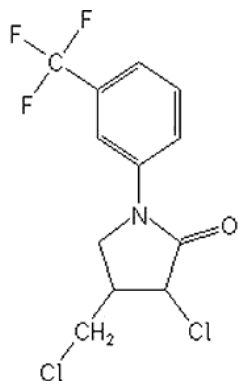
Stopnja razgradnje v vodnih sistemih je stopnja razgradnje kemikalije v vodno-sedimentnih sistemih, izražena kot DT_{50} (dni). Podatki so podani za sistem kot celoto in za vodno fazo samo. Tudi ta vrednost ima določene mejne stopnje.

Mejne vrednosti za razgradnjo v sistemu kot celoti: < 30 = hitro, $30-100$ = srednje hitro, $100-365$ = počasi, > 365 = obstojno. Mejne vrednosti za razgradnjo samo v vodni fazi: < 1 = hitro, $1-14$ = srednje hitro, $14-30$ = počasi, > 30 = obstojno.

Herbicid Sencor WG 70 je po stopnji razgradnje v sistemu kot celoti uvrščen v tretjo skupino ($100-365$ dni), kar pomeni, da je njegova razgradnja počasna (50 dni). Po stopnji razgradnje za samo vodno fazo pa ga uvrščamo v četrto skupino (> 30 dni), kar pomeni, da je dokaj obstojen herbicid (41 dni).

2.2.3 Flurokloridon

Poglavje je povzeto s spletne strani PPDB – Pesticide Properties Data Base, University of Hertfordshire (2011).



Aktivna snov flurokloridon (slika 3) je sistetično pridobljena aktivna snov in je kombinacija različnih izomer. Zato je ne moremo uvrstiti v nobeno kemijsko skupino.

Slika 3: Kemijska formula flurokloridona
(Flurochloridone, 2011)

Flurokloridon je aktivna snov selektivnih herbicidov, ki jih rastline absorbirajo preko korenin, kalčkov in koleoptil. Flurokloridon preprečuje nastanek karotenoida – varovalnega pigmenta za klorofil in tako blokira oziroma inhibira fotosintezo. Učinkuje na številne širokolistne in nekatere travne semenske plevela.

Predvidena stopnja razgradnje herbicida Racer 25 – EC (flurokloridon) je 53 dni, dejanska razpolovna doba pa je 40,6 dneva.

Po stopnji razgradnje v sistemu kot celoti je Racer 25 – EC uvrščen v četrto skupino (> 365 dni), kar pomeni, da je njegova razpolovna doba zelo počasna oziroma je ni.

Po stopnji razgradnje vodne faze je tudi uvrščen v četrto skupino (> 30 dni), kar dokazuje z obstojnostjo 37-ih dni.

3 MATERIAL IN METODE DELA

Poskus je potekal v fitopatološkem laboratoriju Katedre za fitomedicino, kmetijsko tehniko, poljedelstvo, pašništvo in travništvo, na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Entomopatogeno glivo smo izolirali v čiste kulture iz pripravka Naturalis (izolat ATCC 74040).

Testna metoda, ki smo jo uporabili, temelji na navodilih za testiranje učinkov FFS na glivo *B. bassiana* (Coremons-Pelseneer, 1994). Uporabili smo dva herbicida, ki se jih v krompirju uporablja za zatiranje plevelov (pregl. 1).

Preglednica 1: Osnovni podatki o FFS, ki smo jih uporabili v laboratorijskem poskusu

Pripravek	Učinkovina	Delež [%]	Odmerek /ha	Poraba vode [l/ha]		Proizvajalec
				priporočeno	v poskusu	
SENCOR WG 70	metribuzin	70	1,5 kg	300-600	1000	BAYER CS
RACER 25 – EC	flurokloridon	25	4 l	300-600	1000	MACTESHIM AGAN

Priporočena poraba vode za ta dva herbicida je od 300 do 600 litri (povprečje okoli 450 l). V poskusu smo kot osnovo za pripravo raztopin FFS vzeli enotno porabo 1000 litrov vode na hektar. Tako so bile že na začetku poskusa začetne koncentracije herbicidov v agarnih ploščah več kot enkrat nižje, v primerjavi z običajno koncentracijo v uporabljeni škropilni brozgi.

3.1 POTEK RAZISKAVE

V poskus smo vključili dva pogosto uporabljena talna herbicida in preizkusili njuno delovanje oziroma združljivost z glivo *Beauveria bassiana*. Glivo smo gojili na PDA gojišču z dodanima herbicidoma v različnih odmerkih (100 %, 75 %, 50 %, 25 % in 0 % priporočenega poljskega odmerka) in dveh različnih temperaturah (15 °C in 25 °C). Gojili smo v laboratorijsko nadzorovanih (*in vitro*) razmerah. Napravili smo 18 obravnavaj in vsa obravnavanja so bila ponovljena šestkrat. Pri inkubaciji v rastni komori je bila relativna zračna vlaga 60 %.

3.2 UČINEK HERBICIDOV NA RAST MICELIJA GLIVE

Glivo *Beauveria bassiana* smo preizkušali na pripravljenem gojišču. Vzeli smo krompirjev dekstrozni agar (PDA - Merck) in 39 g le tega zamešali v 1 liter vode. Potem smo kuhali v vodni kopeli na kuhalniku, da se je agar raztopil. Po končanem kuhanju smo ga prelili v erlenmajerice, in sicer v vsako 100 ml (za 1 obravnavanje). Dodali smo še magnetna mešala, pripravili tipse in vse skupaj dali sterilizirat v avtoklav na 121 °C in 103,4 kPa za 15-20 minut.

Herbicid Sencor je v obliki močljivih zrn (WG), ki jih je potrebno predhodno raztopiti. V ta namen smo pripravili založno raztopino. V 50 ml deionizirane vode smo raztopili 7,5 g herbicida. Za 100 % poljske odmerke smo potem v 100 ml gojišča s sterilnimi tipsi odpipetirali 1 ml pripravljene raztopine, za 75 % odmerek 0,75 ml, za 50 % odmerek 0,50 ml in za 25 % 0,25 ml.

Herbicid Racer 25 – EC je v obliki koncentrata za emulzijo, zato smo ga lahko dodali neposredno v gojišče. V 100 ml gojišča smo za 100 % odmerek herbicida s sterilnimi tipsi odpipetirali 0,4 ml herbicida, za 75 % odmerek 0,3 ml, za 50 % odmerek 0,2 ml in za 25 % 0,1 ml.

Odmerke herbicidov smo v PDA gojišča dodali preden se je to začelo strjevati (50 °C).

V brezprašni komori (Iskra PIO) smo pripravljena gojišča zlili v petrijevke, približno 15 ml v vsako. 100 ml gojišča je zadoščalo za eno obravnavanje oziroma za 6 petrijev. Uporabili smo sterilne plastične petrijevke (100 x 15 mm; proizvajalec: Kemomed d.o.o., Kranj) (sliki 4 in 5).



Slika 4: Sterilizirane plastične petrijevke (D. Mesec, 2011)



Slika 5: Brezprašna komora (D. Mesec, 2011)

Ko se je gojišče strdilo smo na sredino petrijevk nacepili 14 dni stare micelijske diske ($\varnothing$ 5 mm) glive *Beauveria bassiana*. Petrijevke smo zatesnili s parafilmom, jih označili in dali inkubirat v rastno komoro (tip: RK-900 CH, proizvajalec: Kambič laboratorijska oprema d.o.o., Semič) (slika 6). Rast glive smo nato spremljali in preverjali štirinajst dni pri dveh različnih temperaturah, 25 °C in 15 °C ter 60 % relativne zračne vlage (r.z.v.).



Slika 6: Gojitvena komora (D. Mesec, 2011)

3.3 MERITVE IN OBDELAVA PODATKOV

Po 7 in 14 dneh smo ugotavljali prirast micelija glive *B. bassiana*. Izmerili smo premer micelija po dolžini in širini, ter zunanji rob tudi občrtali. Po štirinajstdnevni inkubaciji v gojitvenih komorah smo opazovanje zaključili. Petrijevke smo slikovno prebrali preko optičnega bralnika in površinsko prirast micelija določili z računalniškim programom Nis Elements BR 2.30 (Nikon Instruments Inc., ZDA). Zbrane podatke smo tabelarično uredili v programu Excel ter statistično obdelali podatke s pomočjo programa Statgraphics Plus (Student-Newman-Keuls test pri 5 % tveganju).

Iz pridobljenih podatkov smo izračunali tudi inhibicijski učinek posameznega odmerka na rast micelija glive *B. bassiana* in glede na to določili stopnjo škodljivosti posameznega herbicida na organizem. Zgledovali smo se po stopnjah škodljivosti, ki so jih v prejšnjih raziskavah uporabili Sterk in sod. (2002).

Stopnje škodljivosti obsegajo štiri razrede: 1 = neškodljiv (< 25 % inhibicija rasti), 2 = rahlo škodljiv (25 – 50 %), 3 = zmerno škodljiv (51 – 75 %), 4 = škodljiv (> 75 %) (Sterk in sod., 2003).

Odstotek inhibicije smo izračunali po formuli:

$$I(\%) = \frac{K-F}{K} * 100$$

... (1)

I(%) – odstotek inhibicije; K – površina micelija v kontrolnem obravnavanju; F – površina micelija v obravnavanju s herbicidom.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V prvem delu poskusa smo uporabili herbicidna pripravka Sencor WG 70 (metribuzin) in Racer 25 – EC (flurokloridon) v štirih različnih koncentracijah ter preučevali njun učinek na rast micelija entomopatogene glive *B. bassiana* pri temperaturi 15 °C in 60 % r.z.v. Naredili smo 8 obravnavanj s po šestimi ponovitvami in dodali tudi kontrolno obravnavanje. Rezultate smo vpisali v preglednico 2.

Preglednica 2: Povprečna površina in inhibicija rasti micelija glive *B. bassiana* pri dveh pripravkih v različnih odmerkih po 7 in 14 dneh pri temperaturi 15 °C

Obravnavanje	Ponovitev	Povprečna površina po 7 dneh [cm ²]	Inhibicija po 7 dneh [%]	Povprečna površina po 14 dneh [cm ²]	Inhibicija po 14 dneh [%]	Stopnja* škodljivosti
Kontrola	6	2,98	0	12,15	0	
Sencor 25 %	6	1,70	43,01	6,29	48,23	2
Sencor 50 %	6	0,99	66,89	2,26	81,40	4
Sencor 75 %	6	0,81	72,82	1,85	84,75	4
Sencor 100 %	6	0,63	79,03	1,46	87,98	4
Racer 25 %	6	0,29	90,27	0,91	92,52	4
Racer 50 %	6	0,19	93,57	0,30	97,50	4
Racer 75 %	6	0,18	93,90	0,18	98,50	4
Racer 100 %	6	0,26	91,44	0,26	97,99	4

* 1 = neškodljiv (< 25 % inhibicija rasti), 2 = rahlo škodljiv (25 – 50 %), 3 = zmerno škodljiv (51 – 75 %), 4 = škodljiv (> 75 %) (Sterk in sod., 2003)

Podatke smo statistično iz vrednotili s pomočjo Student-Newman-Keuls testa pri 5-odstotnem tveganju.

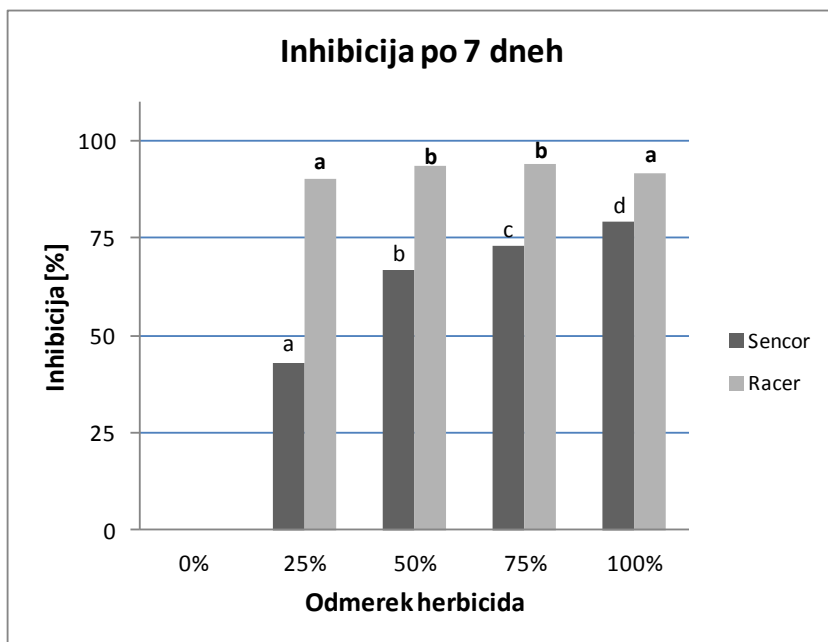
Povprečna površina micelija v kontrolnem obravnavanju brez dodanega herbicida je bila 2,98 cm².

Ugotovili smo, da v gojiščih z dodanim herbicidom Sencor WG 70 (metribuzin) po 7 dneh pri temperaturi 15 °C nastopijo statistično značilne razlike med obravnavanji oz. odmerki pripravka.

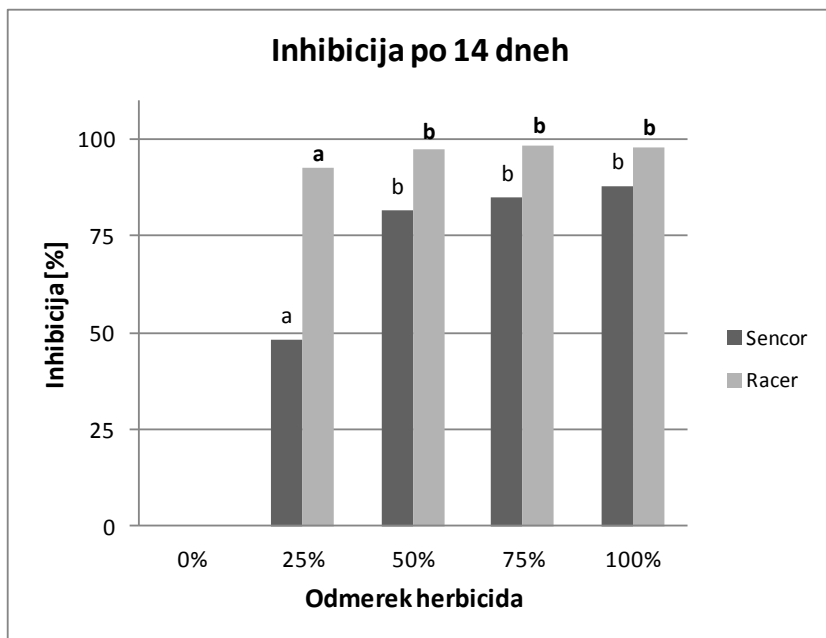
Pri 25 % odmerku je bila povprečna površina 1,7 cm² oziroma je inhibicija prirasta 43,01 %. Pri 50 % odmerku je bila povprečna površina 0,99 cm² oziroma je inhibicija prirasta 66,89 %. Pri 75 % odmerku je bila povprečna površina 0,81 cm² oziroma je inhibicija prirasta 72,82 %. Pri 100 % priporočenem odmerku je bila povprečna površina 0,63 cm² oziroma je inhibicija prirasta znašala 79,03 %.

Pri pripravku Racer 25 – EC (flurokloridon) po 7 dneh ni statističnih razlik med obravnavanji s 25 % in 100 % odmerkom herbicida, saj inhibiciji med seboj ne odstopata. Prav tako ni statistično značilnih razlik med 50 % in 75 % koncentracijo.

Pri 25 % odmerku je bila povprečna površina 0,29 cm² oziroma je inhibicija prirasta 90,27 %. Pri 50 % odmerku je bila povprečna površina 0,19 cm² oziroma je inhibicija prirasta 93,57 %. Pri 75 % odmerku je bila povprečna površina 0,18 cm² oziroma je inhibicija prirasta 93,90 %. Pri 100 % priporočenem odmerku je bila povprečna površina 0,26 cm² oziroma je inhibicija prirasta znašala 91,44 %.



Slika 7: Primerjava inhibicij rasti micelija glive *B. bassiana* pri dveh herbicidih v različnih odmerkih po 7 dneh pri temperaturi 15 °C (različne črke pomenijo statistično značilne razlike v prirastih micelija pri različnih koncentracijah znotraj enega pripravka; navaden tisk Sencor, krepek tisk Racer)



Slika 8: Primerjava inhibicij rasti micelija glive *B. bassiana* pri dveh herbicidih v različnih odmerkih po 14 dneh pri temperaturi 15 °C (različne črke pomenijo statistično značilne razlike v prirastih micelija pri različnih koncentracijah znotraj enega pripravka; navaden tisk Sencor, krepek tisk Racer)

Po 14 dneh smo ponovno izmerili priraste glive *B. bassiana* ter izračunali povprečja površin in inhibicije rasti.

Pri kontrolnem obravnavanju je bila povprečna površina 12,15 cm².

Pri obravnavanju s herbicidom Sencor WG 70 (metribuzin) so bile povprečne površine micelija in inhibicije naslednje: pri 25 % odmerku je bila povprečna površina 6,29 cm² in inhibicija 48,23 %, pri 50 % odmerku je bila povprečna površina 2,26 cm² in inhibicija 81,40 %, pri 75 % odmerku je bila povprečna površina 1,85 cm² in inhibicija 84,75 %, pri 100 % priporočenem odmerku pa je bila povprečna površina 1,46 cm² in inhibicija 87,98 %.

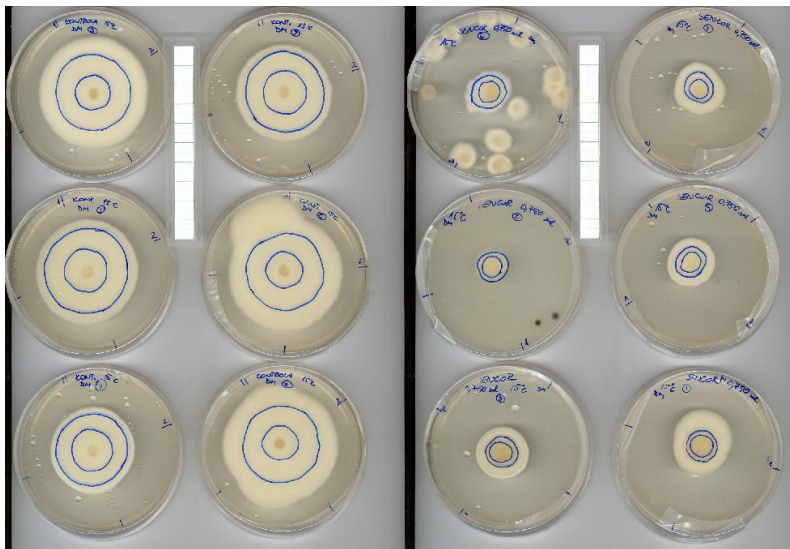
Pri obravnavanju s herbicidom Racer 25 – EC (flurokloridon) so bile povprečne površine micelija in pripadajoče inhibicije naslednje: 0,91 cm² in 92,52 % inhibicija pri 25 % odmerku, 0,30 cm² in 97,50 % inhibicija pri 50 % odmerku, 0,18 cm² in 98,50 % inhibicija pri 75 % odmerku ter 0,26 cm² in 97,99 % inhibicija pri 100 % priporočenem odmerku.

Iz pridobljenih podatkov smo ugotovili, da oba pripravka po 14 dneh pri temperaturi 15 °C in 60 % r.z.v. ter vseh odmerkih močno negativno vplivata na rast in razvoj micelija entomopatogene glive *Beauveria bassiana*.

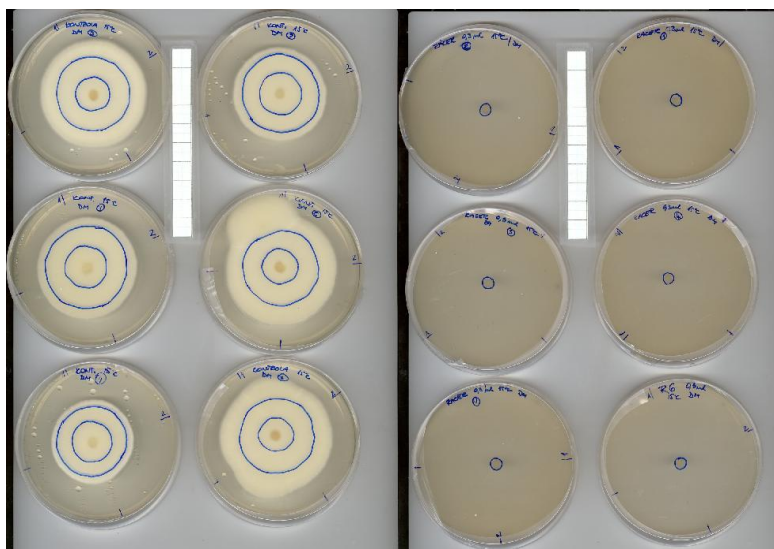
Racer 25 – EC (flurokloridon) vpliva negativno oziroma ima fungistatični učinek na rast že pri zelo majhnem odmerku, torej 25 % odmerku.. Med večjimi odmerki ni statistično značilnih razlik, kar pomeni, da ima 50 % odmerek enak negativni učinek kot 100 %. Rast micelija ob dodatku herbicida se je v primerjavi s kontrolnim obravnavanjem zmanjšala za kar 90 %.

Sencor WG 70 (metribuzin) prav tako negativno vpliva na rast in razvoj micelija glive, vendar je fungistatičen učinek nekoliko manjši kot pri aktivni snovi flurokloridon. V primerjavi s kontrolnim obravnavanjem je rast micelija ob dodatku najmanjše koncentracije Sencorja, v povprečju manjša za kar 50 %. Med 50, 75 in 100 % odmerkom ni statistično značilnih razlik v inhibiciji rasti micelija.

Iz slike 9 in 10 je lepo opazna razlika v rasti oziroma inhibiciji rasti micelija glive *B. bassiana*.



Slika 9: Primerjava prirasta micelija glive *Beauveria bassiana* v petrijevkah brez dodanega metribuzina (levo) in v petrijevkah s 75 % poljskega odmerka metribuzina (desno) pri temperaturi 15 °C in 60 % r.z.v.



Slika 10: Primerjava prirasta micelija glive *Beauveria bassiana* v petrijevkah brez dodanega flurokloridona (levo) in v petrijevkah s 75 % poljskega odmerka flurokloridona (desno) pri temperaturi 15 °C in 60 % r.z.v.

Prejšnji poskus smo ponovili pri temperaturi 25 °C in 60 % r.z.v.. Naredili smo 8 obravnavanj s po šestimi ponovitvami in dodali tudi kontrolno obravnavanje (gojišče brez herbicida).

Tudi v tem poskusu smo površinske priraste micelija ugotavljali po 7 in 14 dneh. Za statistično iz vrednotenje dobljenih podatkov smo uporabili test Student-Newman-Keuls pri tveganju 5 %.

Preglednica 3: Povprečna površina in inhibicija rasti micelija glive *B. bassiana* pri dveh pripravkih v različnih odmerkih po 7 in 14 dneh pri temperaturi 25 °C

Obravnavanje	Ponovitev	Povprečna površina po 7 dneh [cm ²]	Inhibicija po 7 dneh [%]	Povprečna površina po 14 dneh [cm ²]	Inhibicija po 14 dneh [%]	Stopnja* škodljivosti
Kontrola	6	6,17	0	19,93	0	
Sencor 25 %	6	3,30	46,54	9,81	50,78	2-3
Sencor 50 %	6	1,37	77,82	3,15	84,19	4
Sencor 75 %	6	1,17	81,12	2,85	87,54	4
Sencor 100 %	6	1,04	83,12	1,63	91,82	4
Racer 25 %	6	0,51	91,76	1,23	93,82	4
Racer 50 %	6	0,23	96,22	0,38	98,12	4
Racer 75 %	6	0,18	97,14	0,18	99,11	4
Racer 100 %	6	0,19	96,95	0,19	99,06	4

* 1 = neškodljiv (< 25 % inhibicija rasti), 2 = rahlo škodljiv (25 – 50 %), 3 = zmerno škodljiv (51 – 75 %), 4 = škodljiv (> 75 %) (Sterk in sod., 2003)

Po enem tednu je bila povprečna površina micelija pri kontrolnem obravnavanju 6,17 cm².

Pri obravnavanju z dodanim herbicidom Sencor WG 70 (metribuzin) je bila pri 25 % odmerku površina 3,30 cm² in inhibicija 46,54 %. Pri 50 % odmerku je bila povprečna površina 1,37 cm² in inhibicija 77,82 %. Pri 75 % odmerku je bila povprečna površina 1,17 cm² in inhibicija 81,12 %. Pri največjem oziroma 100 % priporočenem odmerku pa je bila površina 1,04 cm² in inhibicija 83,12 %.

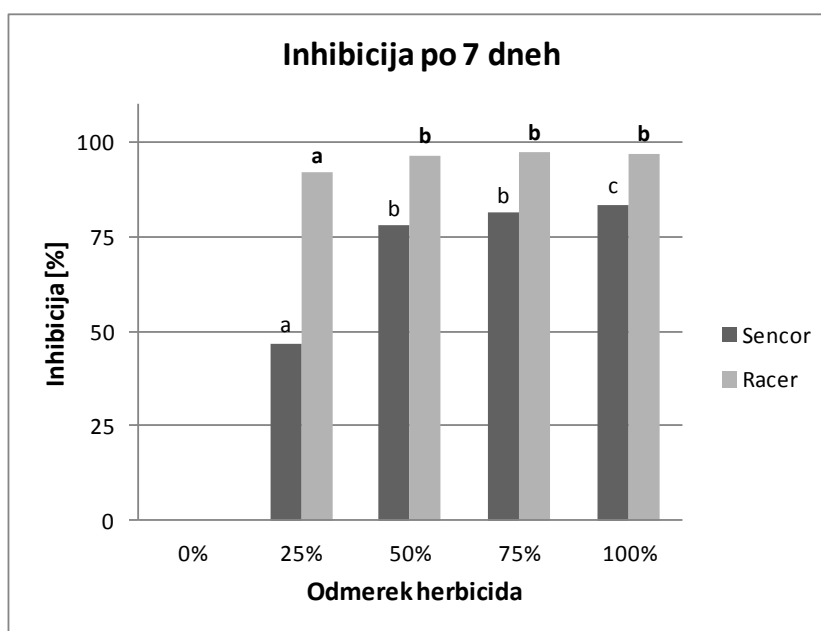
Obravnavanje, pri katerem smo dodali herbicid Racer 25 – EC (flurokloridon) je bila povprečna površina pri 25 % odmerku 0,51 cm² in pripadajoča inhibicija 91,76 %. Pri 50 % odmerku je bila povprečna površina 0,23 cm² in inhibicija 96,22 %. Pri 75 % odmerku je bila povprečna površina 0,18 cm² in inhibicija 97,14 %. Pri največjem oziroma 100 % priporočenem odmerku pa je bila povprečna površina micelija 0,19 cm² in inhibicija 96,95 %.

Po 14 dneh smo ponovno izmerili površine micelija glive *B. bassiana*. Povprečna površina micelija kontrolnega obravnavanja (brez dodanega herbicida) je bila 19,93 cm².

Pri obravnavanju z dodanim herbicidom Sencor WG 70 (metribuzin) smo ugotovili naslednje povprečne površine micelija oziroma inhibicijo: pri 25 % odmerku je bila površina 9,81 cm² oziroma 50,78 % inhibicija, pri 50 % odmerku je bila površina micelija 3,15 cm² oziroma inhibicija 84,19 %, pri 75 % odmerku je bila povprečna površina

2,85 cm² oziroma 87,54 % inhibicija ter pri 100 % priporočenem odmerku je bila povprečna površina 1,63 cm² oziroma 91,82 % inhibicija.

Pri obravnavanju z dodanim herbicidom Racer 25 – EC (flurokloridon) pa smo ugotovili naslednje povprečne površine micelija oziroma inhibicijo: pri 25 % odmerku je bila površina 1,23 cm² oziroma 93,82 % inhibicija, pri 50 % odmerku je bila površina 0,38 cm² oziroma 98,12 % inhibicija, pri 75 % odmerku je bila površina 0,18 cm² oziroma 99,11 % inhibicija ter pri 100 % priporočenem odmerku je bila povprečna površina 0,19 cm² oziroma 99,06 % inhibicija.

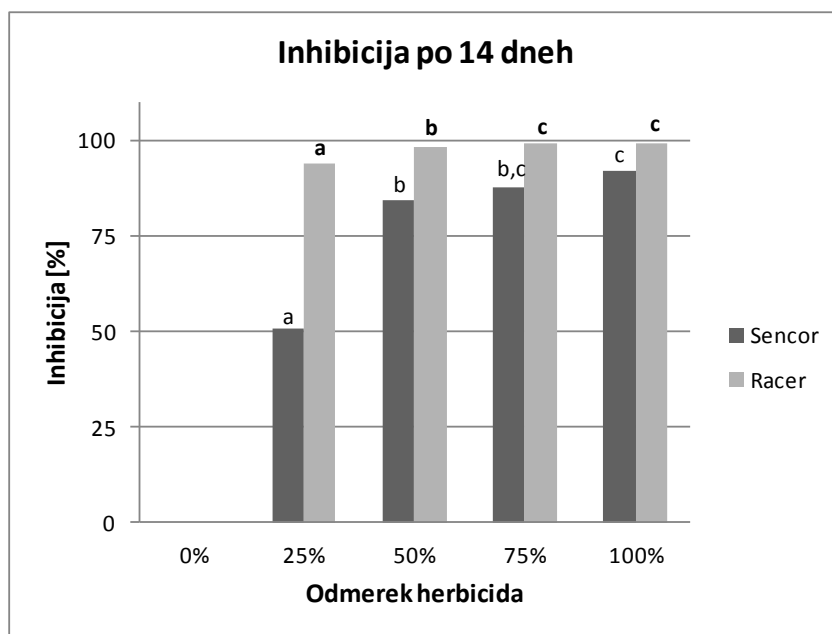


Slika 11: Primerjava inhibicij rasti micelija glive *B. bassiana* pri dveh herbicidih v različnih odmerkih po 7 dneh pri temperaturi 25 °C (različne črke pomenijo statistično značilne razlike v prirastih micelija pri različnih koncentracijah znotraj enega pripravka; navaden tisk Sencor, krepek tisk Racer)

Ugotovili smo, da po 7 dneh obstajajo statistične razlike med obravnavanji. Iz slike 11 je vidno, da pri pripravku Sencor WG 70 (metribuzin) statistične razlike nastopijo med 25 % odmerkom in ostalimi obravnavanji. Razlike niso statistično značilne med 50 % in 75 % odmerkom ter 75 % in 100 % odmerkom, medtem ko med 50 % in 100 % razlika obstaja.

Pri pripravku Racer 25 – EC (flurokloridon) po 7 dneh razlika nastopi med 25 % in vsemi ostalimi odmerki. Med 50 %, 75 % in 100 % odmerkom ni statistično značilnih razlik.

Z meritvami površine micelija in statistično analizo podatkov smo ugotovili, da so pri pripravku Sencor (metribuzin) rezultati enaki kot po 7 dneh. Pri pripravku Racer (flurokloridon) pa razlika nastopi med 25 %, 50 % in 75 % odmerkom, medtem ko med 75 % in 100 % odmerkom ni statistično značilnih razlik.

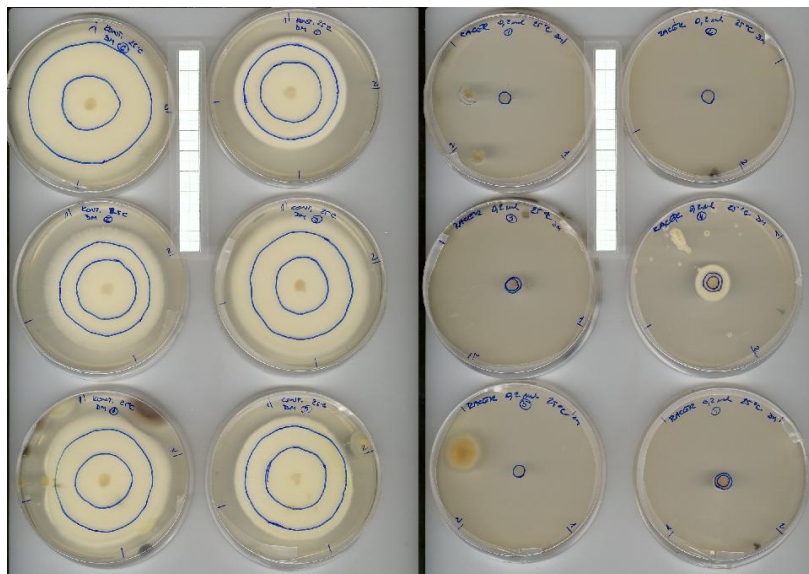


Slika 12: Primerjava inhibicij rasti micelija glive *B. bassiana* pri dveh herbicidih v različnih odmerkih po 14 dneh pri temperaturi 25 °C (različne črke pomenijo statistično značilne razlike v prirastih micelija pri različnih koncentracijah znotraj enega pripravka; navaden tisk Sencor, krepek tisk Racer)

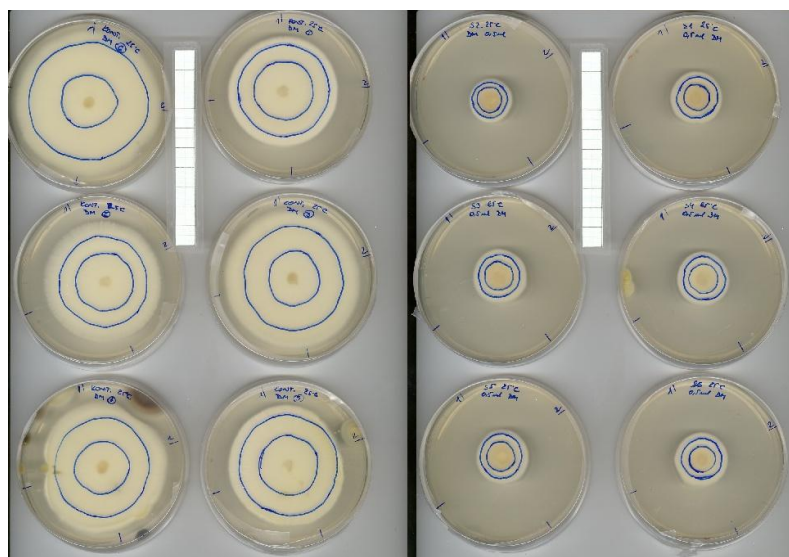
Iz pridobljenih podatkov smo tudi pri temperaturi 25 °C in 60 % r.z.v. ter vseh odmerkih obeh učinkovin zaznali močan negativen vpliv na rast micelija glive.

Flurokloridon ima fungistatični učinek na rast micelija že pri zelo majhnem odmerku, torej 25 % odmerku, saj je inhibicija v primerjavi s kontrolnim obravnavanjem kar 90 %.

Metribuzin tudi negativno vpliva na rast micelija glive, vendar je fungistatičen učinek manjši kot pri flurokloridonu. V primerjavi s kontrolnim obravnavanjem je rast micelija, tudi pri temperaturi 25 °C v povprečju manjša za kar 50 %.

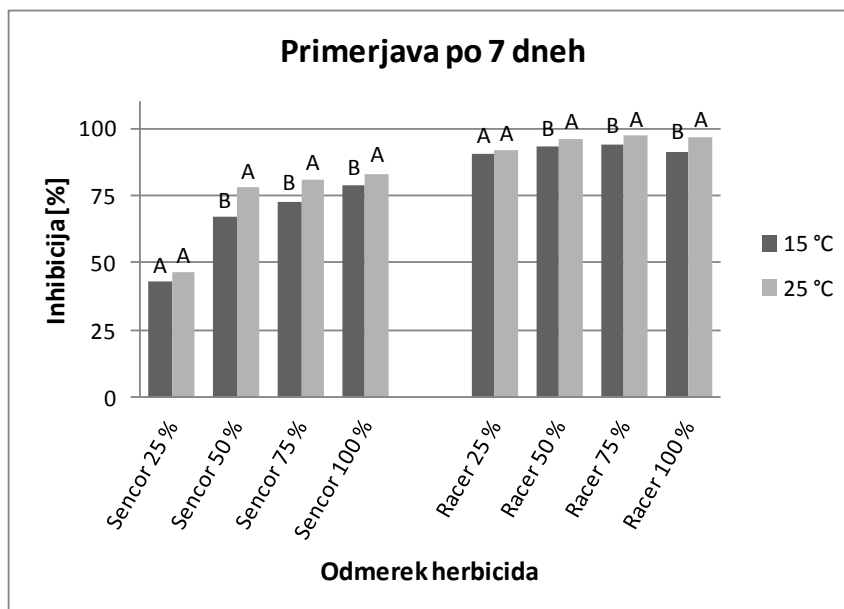


Slika 13: Primerjava prirasta micelija glive *B. bassiana* v kontrolnih petrijevkah (levo) in v petrijevkah s 50 % poljskim odmerkom flurokloridona (desno) pri temperaturi 25 °C in 60 % r.z.v.

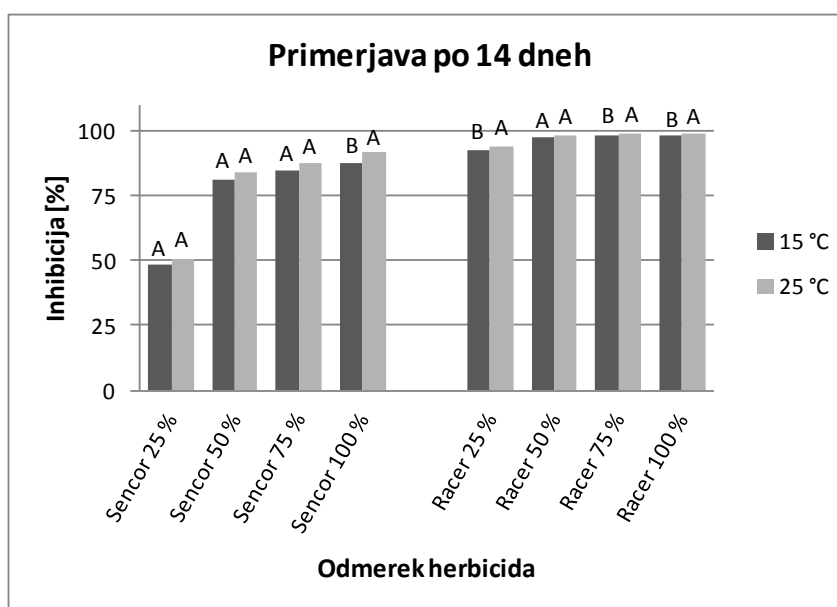


Slika 14: Primerjava prirasta micelija glive *B. Bassiana* v kontrolnih petrijevkah (levo) in v petrijevkah s 50 % poljskim odmerkom metribuzina (desno) pri temperaturi 25 °C in 60 % r.z.v..

Vzporedno smo ugotavljali tudi statistično značilne razlike v inhibiciji rasti micelija glive *B. bassiana* med različnima temperaturama.



Slika 15: Povprečne inhibicije rasti micelija glive *B. bassiana* po 7 dneh pri različnih odmerkih herbicidov, dveh različnih temperaturah (15 °C in 25 °C) in 60 % r.z.v.



Slika 16: Povprečne inhibicije rasti micelija glive *B. bassiana* po 14 dneh pri različnih odmerkih posameznega herbicidov, dveh različnih temperaturah (15 °C in 25 °C) in 60 % r.z.v.

Z velikimi črkami smo označili statistično značilne razlike v prirastih micelija v okviru posameznega pripravka pri istem odmerku in različnih temperaturah.

Po 7 dneh smo ugotovili statistično značilne razlike pri obeh herbicidih. Pri pripravku Sencor (metribuzin) je ugotovljena statistično značilna razlika med odmerki 50 %, 75 % in 100 %, medtem ko pri 25 % odmerku ni statistične razlike. Pri pripravku Racer (flurokloridon) smo dobili popolnoma enak rezultat.

Po 14 dneh pri pripravku Sencor statistično značilna razlika nastopi le še pri 100 % odmerku, medtem ko pri odmerkih 25 – 75 % do razlik ne prihaja. Pri pripravku Racer pa statistične razlike nastopijo pri odmerkih 25 %, 75 % in 100 %, pri 50 % pa le-teh ni bilo.

Inhibicija je pri obeh pripravkih v povezavi s količino herbicida v gojišču, pri pripravku Racer (flurokloridon) pa tudi s temperaturo, saj je inhibicija pri 25 °C statistično značilno večja.

V eni od prejšnjih raziskav so ugotovili, da na fungicidno delovanje pripravkov, poleg aktivne snovi, vpliva tudi formulacija pripravka (Morjan in sod., 2002). To pomeni, da rezultatov ne moremo posploševati in prenašati na vse pripravke z isto aktivno snovjo.

Mietkiewski in sod. (1997) so v svojih poljskih in laboratorijskih poskusih preučevali vpliv petih pesticidov (benomil – fungicid, triadimefon – fungicid, aldikarb – insekticid, klorfenvinfos – insekticid, glifosat – herbicid) na spekter in številčnost entomopatogenih gliv. Poskus je potekal pri temperaturah 18 °C in 26 °C. Za privabljanje gliv so v poljskem poskusu dodajali ličinke *Galleria mellonella*. Ličinko je okužilo pet vrst gliv. Vrsta *Beauveria bassiana* je bila prevladujoča vrsta in edina, pri kateri je bila okužba dovolj velika, da so lahko naredili statistično analizo. V najmanjši količini je bila gliva prisotna v tleh tretiranih z benomilom. Njegov škodljiv učinek na glivo *B. bassiana* so dokazali v in vitro poskusih, kjer je benomil bistveno onesposobil glivično rast. Enake rezultate so dobili tudi pri učinkovini klorfenvinfos. Triadimefon je v poljskih poskusih spodbudil rast glive *B. bassiana*, v in vitro poskusih pa se je izkazalo ravno obratno. Pri aldikarbu se je izkazalo v in vitro razmerah, da le ta spodbuja glivično rast. Na splošno so ugotovili, da je gliva *B. bassiana* bistveno slabše priraščala pri temperaturi 26 °C kot pa pri 18 °C.

Pesticidi imajo lahko neposreden vpliv na naravni pojav, zmožnost okužbe in populacijsko dinamiko entomopatogenih gliv. Prav tako vplivajo na druge makro- in mikroorganizme v tleh, ki so lahko v interakciji z entomopatogenimi glivami. V kombinaciji z podnebnimi in talnimi spremenljivkami, je učinke na glive težko ločiti. Ta študija je pokazala, da uporabljeni pesticidi na poljih, verjetno ne ubijejo vseh prisotnih entomopatogenih gliv, vsekakor pa omejijo njihovo kolonizacijo oziroma ponovno naselitev.

V eni od študij v Iranu so v in vitro razmerah preiskovali združljivost glive *B. bassiana* s petimi insekticidi (imidaklopid, flufenoksuron, teflubenzuron, endofulfan in amitraz). Preučevali so tudi vpliv le teh na kaljivost konidijev, vegetativno rast in oblikovanje spor. Insekticidi so bili testirani v treh odmerkih (osnovni odmerek – x, $\frac{1}{2}$ x in 2 x). Vsa FFS so zavirala vegetativno rast glive *B. bassiana*. Flufenoksuron je popolnoma nezdržljiv z glivo, saj je povzročil popolno inhibicijo rasti micelija. Pri ostalih pripravkih je bila

inhibicija rasti micelija manjša, vendar še vedno prevelika za sočasno uporabo z glivo *B. bassiana*. Imidakloprid ni imel nobenega negativnega vpliva na entomopatogeno glivo, zato ga je možno uporabiti sočasno z glivo tudi v okviru celostnega zatiranja škodljivcev. Insekticidi so vplivali na vegetativno rast in sporulacijo glive *B. bassiana* in tudi kalitev spor (Alizadeh in sod., 2007).

Zelo pomembna pri glivah je sposobnost konidijev, da kalijo na gostitelju, ga okužijo in posledično usmrtiljo (Batista Filho in sod., 1998, cit. po Alizadeh in sod., 2007; De Olivera in Neves, 2004, cit. po Alizadeh in sod., 2007).

Tudi Anderson in Roberts (1983, cit. po De Oliveria in sod., 2004) sta ugotovila, da je kaljivost pomemben kriterij pri skladnosti pesticida z entomopatogeno glivo v in vitro razmerah.

Todorova in sod. (1998) so okrepili pomembnost vpliva pesticidov na kaljivost konidijev, ker so te glivične strukture odgovorne za nastanek oziroma pojav prvega žarišča bolezni na nekem področju oziroma okolju. Poudarili so tudi, da inhibicija kaljivosti zaradi prisotnosti pesticidov ogroža patogena, bodisi tistega, ki je že prisoten v kmetijskem ekosistemu ali tistega, ki je v sistem umetno vnesen.

Obstoj in preživetje konidijev entomopatogene glive *Beauveria bassiana* je povezan z agrokemikalijami, okoljskimi dejavniki in drugimi kemičnimi sredstvi za varstvo rastlin, s katerimi glive pridejo v stik v tleh (Anderson in Roberts, 1983, cit. po Alizadeh in sod., 2007; Loria in sod., 1983, cit. po Alizadeh in sod., 2007; Alves in Lecuona, 1998, cit. po Alizadeh in sod., 2007).

Herbicidi in ostali pesticidi lahko onemogočijo delovanje oziroma imajo sinergijski učinek in morebitno insekticidno delovanje na glivo *B. bassiana* (Benz, 1987).

Loria in sod. (1993, cit. po Jaros-Su in sod., 1999) so preučevali obstoj konidijev glive *Beauveria bassiana* po vnosu fungicidov v agar v laboratorijskih razmerah in nanosu konidijev na krompirjeve liste v poljskem poskusu. Uporabili so fungicide makozeb in metiram, ki sta inhibirala obstojnost konidijev v agarnih ploščah, medtem ko se je v in vitro razmerah izkazalo, da je kljub uporabi fungicidov količina konidijev primerljiva s kontrolo. Zelo pomemben dejavnik za obstoj konidijev glive *B. bassiana* predstavlja tudi časovni zamik pri nanosu kemičnih sredstev v naravnih razmerah.

5 POVZETEK IN SKLEPI

Biotično varstvo je način obvladovanja škodljivih organizmov v kmetijstvu in gozdarstvu, ki uporablja žive naravne sovražnike, antagoniste ali kompetitorje ali njihove produkte in druge organizme, ki se lahko sami razmnožujejo.

Gliva *Beauveria bassiana* je patogen različnih vrst škodljivcev. Uporabljamo jo kot biotični insekticid za zatiranje termitov, resarjev, listnih uši, raznih hroščev, idr.

Uporaba kemičnih sredstev postaja vedno bolj sporna z okoljevarstvenega, ekološkega in vodovarstvenega vidika. Redna uporaba ima številne negativne posledice, predvsem kopičenje v tleh, ki ima lahko negativen vpliv na učinkovitost entomopatogenih gliv. Znanje o združljivosti med entomopatogeno glivo *B. bassiana* in običajno uporabljenimi herbicidi je ključnega pomena, da izberemo ustrezen pripravek in s tem zmanjšamo kakršen koli negativen vpliv na učinkovitost glive.

Dosedanje tuje raziskave preučevanja določenih herbicidov, fungicidov, insekticidov in ostalih kemičnih sredstev so pokazale, da večina le teh negativno vpliva na rast in razvoj biotičnih agensov.

Naš poskus je potekal na Biotehniški fakulteti, oddelku za agronomijo, na katedri za fitomedicino, kmetijsko tehniko, poljedelstvo, pašništvo in travništvo. V poskus smo vključili dva pogosto uporabljena talna herbicida Sencor WG 70 (metribuzin) in Racer 25 – EC (flurokloridon) in preizkusili njuno delovanje na glivo *Beauveria bassiana*. Glivo smo gojili na PDA gojišču z dodanima herbicidoma v različnih odmerkih (100, 75, 50, 25 in 0 % priporočenega poljskega odmerka) in dveh različnih temperaturah (15 °C in 25 °C). Prirast micelija glive smo ugotavljali po 7 in 14 dneh, tako da smo občrtali zunanji rob micelija. Po 14 dneh smo vseh 18 obravnavanj skenirali ter jim površino prirasti določili z računalniškim programom Nis Elements BR2.30 (Nikon Instruments Inc., ZDA). Nato smo izračunali tudi zaviralni učinek oziroma inhibicijo na glivo.

Uporabljena herbicida Sencor WG 70 (metribuzin) in Racer 25 – EC (flurokloridon) imata zelo negativen vpliv na rast micelija entomopatogene glive *Beauveria bassiana*.

Metribuzin negativno vpliva na rast in razvoj micelija glive že pri 25 % priporočenega poljskega odmerka, vendar ima večji inhibični učinek pri večjih koncentracijah. Pripravek zavira rast glive *Beauveria bassiana* od 43 do 92 %.

Flurokloridon ima fungistatični učinek na rast in razvoj micelija glive že pri zelo majhnem odmerku, to je 25 %. Njegov učinek je v primerjavi z metribuzinom veliko bolj zaviralen, torej fungistatičen. Rast micelija glive zavira od 91 do 99 %.

V *in vitro* razmerah sta oba talna herbicida delovala fungistatično oz. zaviralno na rast micelija entomopatogene glive *Beauveria bassiana*. Bolj zaviralno je deloval herbicidni pripravek Racer 25 – EC (flurokloridon), nekoliko manj pa Sencor WG 70 (metribuzin). Ugotovili smo, da je inhibični učinek pripravka Racer (flurokloridon) v korelaciji s

temperaturo, saj je bila inhibicija pri 25 °C statistično značilno večja. To pomeni, da na inhibicijo rasti micelija delno vpliva tudi temperatura okolja.

Inhibicija je bila pri vseh obravnavanjih tudi v korelaciji s količino herbicida v gojišču. Pri večjih koncentracijah herbicidov v gojišču se je povečala tudi inhibicija glive.

Po stopnji škodljivosti uvrščamo oba pripravka med škodljive herbicide, zato njuna sočasna uporaba z biotično glivo v integrirani pridelavi ni priporočljiva.

Dobljene laboratorijske poskuse je potrebno preizkusiti v naravnih razmerah na polju, saj idealnih razmer v laboratoriju ne moramo enačiti z zunanjimi, naravnimi razmerami. Šele s pridobljenimi rezultati poljskega poskusa bomo lahko potrdili ali zavrnili rezultate pridobljene v laboratoriju.

6 VIRI

- Alizadeh A., Samih M. A., Khezri M., Riseh R. S. 2007. Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with several pesticides. *International Journal of Agriculture in Biology*, 9, 1: 31-34
- Ambethgar V., Swamiappan M., Rabindra R. J., Rabindran R. 2009. Influence of some herbicides on in vitro vegetative growth of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Resistant Pets Management Newsletter*, 19, 1: 13-16
- Benz G. 1987. *Environment. V: Epizootiology of Insect diseases*. Fuxa J. R. and Tanada Y. 1987 (eds.). New York, Wiley: 174-214
- Celar F. A. 2006, *Fitofarmacavtska sredstva: fungicidi in herbicidi*. Študijsko gradivo za področje varstva rastlin. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: CD - ROM
- Celar F. A., Kos K., Sekne Š., Mesec D. 2011. Učinek herbicidov in fungicidov na rast micelija entomopatogene glive *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. V: Zbornik predavanj in referatov 10. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Podčetrtek 1.-2. marec 2011. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 171-174
- Coremons Pelseneer, J. 1994. Laboratory tests on the entomopathogenic fungus *Beauveria*. *IOBC/WPRS Bulletin* 17, 10: 147-154
- De Oliveria R. C., Neves P. M. O. J. 2004. Compatibility of *Beauveria bassiana* with Acaricides. *Neotropical Entomology*, 33, 3: 353-358
- FITO – INFO - Slovenski informacijski sistem za varstvo rastlin.
<http://www.fito-info.si> (27.10.2011)
- Flurochloridone. PPDB – Pesticide Properties Data Base, University of Hertfordshire.
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/> (27.10.2011)
- Glare T. R., Milner R. J. 1991. *Ecology of entomopathogenic fungi*. V: *Handbook of applied mycology*. Vol.2: Humans, animals and insects. Arora D.K., Ajello L. Mukerji K.G. (eds.). New York, Marcel Dekker: 547-612
- Hongo entomopatogeno afectando larva de Spodoptera frugiperda.
<http://entopcastillo.blogspot.com/2010/12/hongo-entomopatogeno-afectando-larva-de.html>
- Ihara F. 2007. Entomopathogenic fungi database (EFDB). Tsukuba, National Institute of Fruit Tree Science
<http://www.fruit.affrc.go.jp/kajunoheya/epfdb/Ebun/eindex.htm> (24.9.2011)
- Jaros-Su J., Groden E., Zhang J. 1999. Effects of selected fungicides and the timing of fungicide application on *Beauveria bassiana* – induced mortality of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biological Control*, 15: 259-269

- Lacey L. A., Frutos R., Kaya H. K., Vail P. 2001. Insect pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biological Control*, 21: 230-248
- Lešnik M. 2007. Tehnika in ekologija zatiranja plevelov. Ljubljana, Kmečki glas: str. 243
- Mahr S. 1997. The Entomopathogen *Beauveria bassiana*. *Midwest Biological Control News (MBCN online)* IV, 10
<http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/kyf410.html> (25.9.2011)
- Metribuzin. PPDB – Pesticide properties data base. University of Hertforshire.
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/> (27.10.2011)
- Mietkiewski R. T., Pell J. K., Clark S. J. 1997. Influence of pesticides use on the natural occurrence of entomopathogenic fungi in arabe soils in he UK: Field and laboratory comparisons. *Biocontol Science and Technology*, 7, 4: 565-575
- Milevoj L. 2007. Kmetijska entomologija. Splošni del. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 182 str.
- Morjan W. E., Pedigo L. P., Lewis L. C.. 2002. Fungicidal effects of glyphosate and glyphosate formulations on four species of entomopathogenic fungi. *Environmental Entomology*, 3, 6: 1206-1212
- Poprawski T. J., Majchrowicz I. 1995. Effects of herbicides on *in vitro* vegetative growth and sporulation of entomopathogenic fungi. *Crop Protection*, 14, 1: 81-87
- PPDB – Pesticide properties data base, University of Hertforshire.
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/> (27.10.2011)
- Roberts D. W., Hajek A. E. 1992. Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. V: *Frontiers in industrial microbiology*. Leatham G. F. (ed.). London, Chapman & Hall: 144-159
- SSKJ 2008. Slovar slovenskega knjižnega jezika: priročni ponatis v petnajstih knjigah. Ljubljana, DZS: 15 zv.
- Storey G. K. and Gardner W. A. 1986. Sensitivity of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* to selected plant growth regulators and spray additives. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 1: 1-3
- Sterk G., Hassan S. A., Baillod M., Bakker F., Bigler F. and other colleagues 1999. Results of the seventh joint pesticide testing programme carried out by the IOBC/WPRS-Working Group 'pesticides and benifical organisms'. *BioControl*, 44: 99-117
- Todorova S. I., Coderre D., Duchesne R. M., Cote J. C. 1998. Compatibility of *Beauveria bassiana* with selected fungicides and herbicides. *Environmental Entomology*, 27, 2: 427-433

ZAHVALA

Ob zaključku diplomske naloge bi se za vsestransko pomoč iskreno zahvalila mentorju prof. dr. Franci Aco Celarju in asistentki Katarini Kos, ki sta mi stala ob strani tudi takrat, ko sta bila prezaposlena s svojim delom. Hvala!

Zahvaljujem se tudi strokovnim sodelavcem katedre, ter vsem ostalim, ki so mi kakor koli pomagali pri omenjeni nalogi. Zahvaljujem se tudi za material, potreben za raziskavo.

Zahvaljujem se tudi članici komisije doc. dr. Darji Kocjan Ačko in predsedniku prof. dr. Francu Batiču za hiter in temeljit končni pregled diplomskega dela.

Hvala vsem domačim, ki ste me spodbujali in mi dajali samozavest takrat, ko sem jo najbolj potrebovala.