

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Špela SEKNE

**UČINEK FUNGICIDOV PROPINEBA IN
FLUAZINAMA 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

Špela SEKNE

**UČINEK FUNGICIDOV PROPINEBA IN FLUAZINAMA NA RAST
IN RAZVOJ ENTOMOPATOGENE GLIVE *Beauveria bassiana*
(Bals.-Criv.) Vuill.**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF FUNGICIDES PROPINEB AND FLUAZINAM ON
MYCELIAL GROWTH AND DEVELOPEMENT OF
ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *Beauveria bassiana*
(Bals.-Criv.) Vuill.**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija kmetijstvo – agronomija. Opravljeno je bilo na Katedri za fitomedicino, kmetijsko tehniko, poljedelstvo, pašništvo in travništvo, Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Francija 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

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

Datum zagovora:

Naloga 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.

Špela Sekne

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 632.937.14:632.952.024.13 (043.2)
KG *Beauveria bassiana*/rast micelija/razvoj/fitofarmaceutvska sredstva/propineb/fluazinam/ biotično varstvo/entomopatogene glive
KK AGRIS H01
AV SEKNE, Špela
SA CELAR, Franci Aco (mentor)
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2012
IN UČINEK FUNGICIDOV PROPINEBA IN FLUAZINAMA NA RAST IN RAZVOJ ENTOMOPATOGENE GLIVE *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 31, [1] str., 4 pregl., 5 sl., 37 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V laboratoriju smo *in vitro* preučevali učinek propineba (Antracol WG 70) in fluazinama (Shirlan 500 SC) na rast micelija entomopatogene glive *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. Glivo smo gojili na PDA gojišču z dodatkom posameznih fungicidov v različnih odmerkih (100, 75, 50, 25 in 0 % priporočenega poljskega odmerka) pri 15 in 25 °C. Fungicida fluazinam in propineb v vseh odmerkih fungistatično delujeta na glivo. Inhibicija rasti micelija je v korelaciji s količino fungicida v gojišču. Temperatura vpliva na prirast micelija ne pa tudi na samo inhibicijo pri fungicidu Antracol. Pri fungicidu Shirlan smo ugotovili vpliv temperature na inhibicijo glive *B. bassiana*. Pripravek Shirlan 500 SC (fluazinam) pri 25 do 100 % priporočenih poljskih odmerkih zavira rast glive od 76 do 89 %, medtem ko pripravek Antracol WG 70 (propineb) pri enakih odmerkih od 52 do 71 %. Fungicida nista primerna za sočasno uporabo z entomopatogeno glivo *B. bassiana*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC UDC 632.937.14:632.952.024.13 (043.2)
CX *Beauveria bassiana*/mycelial growth/development/plant protection product/
propineb/fluazinam/biological control/entomopathogenic fungi
CC AGRIS H01
AU SEKNE, Špela
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 FUNGICIDES PROPINEB AND FLUAZINAM ON MYCELIAL
GROWTH AND DEVELOPEMENT OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS
Beauveria bassiana (Bals.-Criv.) Vuill.
DT Graduation thesis (University studies)
NO IX, 31, [1] p., 4 tab., 5 fig., 37 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the laboratory test the effect of two fungicides; propineb (Antracol WG 70) and fluazinam (Shirlan 500 SC) on the mycelial growth of *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. was evaluated *in vitro*. The fungus was cultured on PDA solid medium where pesticides at different rates (100, 75, 50, 25 and 0% of recommended field application rate) were added at two temperatures, 15 and 25°C. Fluazinam and propineb have in all concentrations fungistatic effect on *B. bassiana*. Inhibition of the mycelial growth was positively correlated with fungicide concentration in the growth medium. The temperature can affect the mycelial growth, but it does not affect the inhibition by fungicide Antracol. We found the temperature affect the inhibition by fungicide Shirlan. Shirlan 500 SC (fluazinam) caused mycelial growth inhibition the fungus at all rates (25 - 100% of normal field application rate) for 76 - 89%, Antracol WG 70 (propineb) also was inhibitory for 52 - 71%. Laboratory test *in vitro* showed incompatibility between these fungicides and *B. bassiana*.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Simboli in okrajšave	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 CILJI NALOGE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 IZVOR IN KLASIFIKACIJA GLIVE <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	3
2.2 SPLOŠNI OPIS, RAZMNOŽEVANJE, POJAVNOST V NARAVI TER RAZŠIRJENOST GLIVE <i>Beauveria bassiana</i>	4
2.3 KROG GOSTITELJEV	5
2.4 NAČIN OKUŽBE GOSTITELJA IN POTEK BOLEZNI (PATOGENEZA)	5
2.5 TVORJENJE METABOLITOV/TOKSINOV	7
2.6 VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV	7
2.7 USODA IN ŠIRJENJE GLIVE <i>B. bassiana</i> V OKOLJU	8
2.7.1 Obstočnost v zraku in mobilnost glive <i>B. bassiana</i>	8
2.7.2 Mobilnost in obstočnost v vodi	8
2.7.3 Mobilnost in obstočnost v tleh	8
2.8 VARNOST PRI UPORABI GLIVE <i>B. bassiana</i> KOT BIOTIČNEGA AGENSA	10
2.9 PRIPRAVKI NA PODLAGI ENTOMOPATOGENE GLIVE <i>B. bassiana</i>	11
2.10 FITOFARMACEVTSKA SREDSTVA KOT NAČIN KEMIČNEGA VARSTVA RASTLIN	13
3 MATERIAL IN METODE DELA	15
3.1 PRIPRAVA GOJIŠČA	15
3.2 NACEPLJANJE GLIVE <i>B. bassiana</i>	16
3.3 MERITVE IN OBDELAVA PODATKOV	16
3.4 OPIS KEMIČNIH AKTIVNIH SNOVI DODANIH V GOJIŠČE	16
3.4.1 Propineb (Antracol WG 70)	16
3.4.2 Fluazinam (Shirlan 500 SC)	17
4 REZULTATI	18
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	25
5.1 RAZPRAVA	25
5.2 SKLEPI	27

6	POVZETEK	28
7	VIRI	29
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Povprečna površina micelija in pripadajoči odstotek inhibicije rasti micelija glive <i>B. bassiana</i> pri različnih odmerkih fungicidov (Shirlan, Antracol) in kontroli pri temperaturi 25 °C po 7 dneh (lab. na Katedri za fitomedicino, 2010)	19
Preglednica 2: Povprečna površina micelija in pripadajoči odstotek inhibicije rasti micelija glive <i>B. bassiana</i> pri različnih odmerkih fungicidov (Shirlan, Antracol) in kontroli pri temperaturi 25 °C po 14 dneh (lab. na Katedri za fitomedicino, 2010)	21
Preglednica 3: Povprečna površina micelija in pripadajoči odstotek inhibicije rasti micelija glive <i>B. bassiana</i> pri različnih odmerkih fungicidov (Shirlan, Antracol) in kontroli pri temperaturi 15 °C po 7 dneh (lab. na Katedri za fitomedicino, 2010)	21
Preglednica 4: Povprečna površina micelija in pripadajoči odstotek inhibicije rasti micelija glive <i>B. bassiana</i> pri različnih odmerkih fungicidov (Shirlan, Antracol) in kontroli pri temperaturi 15 °C po 14 dneh (lab. na Katedri za fitomedicino, 2010)	22

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Rast micelija entomopatogene glive <i>Beauveria bassiana</i> na koloradskem hrošču (Potatobeetle ... , 2011)	1
Slika 2: Merjenje površin v programu Nis Elements BR 2.30 (Nikon Instruments Inc., ZDA) (foto: Špela Sekne, 2011)	19
Slika 3: Povprečne površine micelija glive <i>B. bassiana</i> pri različnih odmerkih dveh fungicidov po enem tednu meritev na temperaturi 15 °C in 25 °C ter 60 % r. z. v. (lab. na Katedri za fitomedicino, 2010)	24
Slika 4: Povprečne površine micelija glive <i>B. bassiana</i> pri različnih odmerkih dveh fungicidov po 14 dneh na temperaturi 15 °C in 25 °C ter 60 % r. z. v. (lab. na Katedri za fitomedicino, 2010)	24
Slika 5: Povprečne inhibicije rasti micelija glive <i>B. bassiana</i> pri različnih odmerkih fungicidov pri temperaturi 15 °C in 25 °C v odstotkih (lab. na Katedri za fitomedicino, 2010)	25

SIMBOLI IN OKRAJŠAVE

B. - *Beauveria*

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

CFU - Colony Forming Units; so vsi delci iz katerih zraste gliva *Beauveria bassiana*

USDA - United States Department of Agriculture

PDA - krompirjev dekstrozni agar

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

1 UVOD

Entomopatogena gliva *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. je ena izmed talnih gliv, ki se uporablja v biotičnem varstvu rastlin (slika 1). Znanih je več kot 700 vrst entomopatogenih gliv, od katerih so primerne za izdelavo biotičnih pripravkov predvsem vrste iz rodov *Beauveria*, *Lecanicillium* in *Metarhizium*.



Slika 1: Rast micelija entomopatogene glive *Beauveria bassiana* na koloradskem hrošču (Potatobeele ... , 2011)

Fitofarmaceutvska industrija izdeluje na podlagi glivnih izolatov naravne pripravke za varstvo proti škodljivim organizmom. Biotični agensi se uporabljajo na območjih, kjer so kemična sredstva za varstvo rastlin prepovedana (vodovarstvena območja), so v opuščanju ali so postala neučinkovita zaradi razvoja odpornosti škodljivih organizmov (Gril, 2006).

Kmetijstvo se sooča s težavami zaradi pretirane in enostranske uporabe kemičnih sredstev za zatiranje škodljivcev. Kemični pripravki so postali pogosto sporni tako z ekološkega, vodovarstvenega in okoljevarstvenega vidika. Pretirana in neustrezna uporaba sredstev za varstvo rastlin predstavlja tveganje za okolje in zdravje ljudi ter živali, predvsem v občutljivih območjih. To je tam, kjer se podtalnica nahaja blizu površja tal, na območjih blizu površinskih vod (oceani, reke), na občutljivih območjih v bližini šol, igrišč, bolnic, na območjih blizu čebelnjakov ipd. (FITO-INFO, 2011).

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).

Biotično varstvo je način varstvenega ukrepa, ki je usmerjen neposredno na škodljivca. Po Zakonu o zdravstvenem varstvu rastlin (2007) je biotično varstvo definirano kot 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.

Zakon opredeljuje tudi domorodne vrste organizmov (tiste vrste, ki so v določenem ekosistemu naravno navzoče) in tujerodne vrste (tiste vrste, ki jih naseli človek in v določenem ekosistemu pred naselitvijo niso bile navzoče). Za namen biotičnega varstva rastlin v zavarovanih prostorih in na prostem je dovoljeno uporabljati le tiste tujerodne vrste organizmov, ki so na seznamu, ki ga objavi minister za kmetijstvo v soglasju z ministrom, pristojnim za ohranjanje narave (FITO-INFO, 2011).

Pravilnik o biotičnem varstvu rastlin (2006) določa seznam domorodnih in tujerodnih vrst organizmov za biotično varstvo rastlin, pogoje za vnos, pogoje glede strokovne in tehnične usposobljenosti oz. pogoje glede prostorov, opreme in kadrov za vnos, gojenje ali uporabo domorodnih in tujerodnih vrst organizmov za biotično varstvo rastlin ter vsebino vloge za izdajo dovoljenja za vnos in uporabo tujerodnih vrst organizmov oz. za gojenje koristnih organizmov (Uporaba ..., 2006).

Pri uporabi biotičnih agensov v kmetijski pridelavi obstaja velika težava pri sočasni uporabi klasičnih kemičnih fitofarmaceutskih sredstev. Podatki o možnosti souporabe so pomanjkljivi in pogosto nasprotujoči.

Kemični pripravki navadno zavirajo delovanje glive *B. bassiana*. Gliva je učinkovitejša pri zatiranju škodljivcev, če jo uporabljamo posamično kot pa skupaj s fungicidi (Benz, 1987, cit. po Alizadeh in sod., 2007). Nezdržljivost fungicidov z entomopatogenimi glivami je pripeljala do razvoja nekaterih sevov glive, ki so odporni na fungicide (Goettel in sod., 1990, cit. po Kouassi in sod., 2003).

1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je ugotoviti možnost souporabe entomopatogene glive *Beauveria bassiana* in dveh klasičnih fitofarmaceutskih sredstev (fungicidov) v integrirani pridelavi. Hoteli smo ugotoviti, ali fungicida fluazinam in propineb vplivata na rast in razvoj entomopatogene glive *B. bassiana*.

1.2 CILJI NALOGE

Z dodanima fungicidoma v gojišče, kjer je rastla gliva *Beauveria bassiana*, smo hoteli v laboratorijskih razmerah ugotoviti možen učinek izbranih fungicidov na njen razvoj. Z opazovanjem rasti glive ter merjenjem prirasta njenega micelija se da ugotoviti, v kolikšni meri vplivata fungicida na razvoj glive. S pridobljenimi podatki bi lahko ugotovili možnost souporabe entomopatogene glive in preučevanih fungicidov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 IZVOR IN KLASIFIKACIJA GLIVE *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.

Pisna zgodovina entomopatogene glive *Beauveria bassiana* sega v leto 1835. V svojem rodu *Beauveria* spada med najdlje poznano glivo. Povezana je z raziskovalcem Agostinom Bassijem di Lodi iz Italije, ki jo je prvi našel na obolelih gosenicah sviloprejke (*Bombyx mori*). Poimenoval jo je »beli muscardine«. Med prvimi je dokazal, da so glive zmožne povzročiti bolezn na žuželkah ter objavil potek bolezni. Glivo so v tistem času opisovali in preiskovali še drugi italijanski naravoslovci. Med njimi je bil Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivelli, kateri je glivo poimenoval *Botrytis bassiana* v čast Bassi-ju (Steinhaus, 1949, cit. po Zimmermann; Müller-Kögler, 1965, cit. po Zimmermann; Rehner, 2005, cit. po Zimmermann, 2007). Raziskovalec Beauverie je ponovno preučeval glivo v letu 1911. Leta 1912 je Vuillemin ustvaril nov rod *Beauveria* poimenovan v čast Beauverie-ju. Po njem in Bassiju je vrsto glive poimenoval *Beauveria bassiana*.

MacLeod je leta 1954 (cit. po Zimmermann, 2007) objavil natančen pregled literature o rodu *Beauveria*. Raziskave vključujejo gojitvene in morfološke lastnosti številnih izolatov in vrst *Beauveria* spp.. V rodu *Beauveria* sta bili poimenovani dve vrsti z imenoma *Beauveria bassiana* in *Beauveria tenella*. Pri obeh vrstah so se oblikovale različice prvotnih imen – sinonimi. *Beauveria bassiana* je bila poimenovana še z naslednjimi izrazi: *Beauveria stephanoderis*, *B. laxa*, *B. globulifera*, *B. effusa*, *B. vexans*, *B. doryphorae*, *B. delacroixii* in *B. acridiorum*. Sinonimi vrste *Beauveria tenella* so *Beauveria densa*, *B. melolonthae*, *B. brongniartii* in *B. shiotae*.

Leta 1972 je De Hoog (cit. po Zimmermann, 2007) omejil rod *Beauveria* Vuill. na 3 vrste: *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii* in *B. alba*. Najpomembnejši sinonimi, ki so se ohranili vse do danes so bili delo večih avtorjev (MacLeod, 1954, cit. po Zimmermann, 2007; De Hoog, 1972, cit. po Zimmermann, 2007; CABI Bioscience in sod., 2006, cit. po Zimmermann, 2007). Sinonimi glive *B. bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin (1912) so:

Beauveria laxa Petch (1931)

Beauveria globulifera (Speg.) Picard (1914)

Botrytis bassiana Balsamo (1835)

Botrytis necans Massee (1914)

Botrytis bassiana Sacc. subsp. *tenella* Delacroix (1937)

Botrytis bassiana var. *lunzinensis* Szilvinyi (1941)

Botrytis brongniartii subsp. *delacroixii* (Sacc.) Delacroix (1893)

Botrytis effusa Beauverie (1911)

Botrytis stephanoderis Bally (1923)

Sporotrichum densum Link (1809)

Sporotrichum globuliferum Spegazzini (1880)

Sporotrichum minimum Speggazzini (1881)

Isaria shiotae Kuru (1931)

Klasifikacija glive *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin (1912):

KRALJESTVO: Fungi – glive

DEBLO: Ascomycota – zaprtotrosnice

PODDEBLO: Pezizomycotina

RAZRED: Sordariomycetes

PODRAZRED: Hypocreomycetidae

RED: Hypocreales

DRUŽINA: Cordycipitaceae

ROD: *Beauveria*

VRSTA: *Beauveria bassiana*

2.2 SPLOŠNI OPIS, RAZMNOŽEVANJE, POJAVNOST V NARAVI TER RAZŠIRJENOST GLIVE *Beauveria bassiana*

B. bassiana je značilno bela, kasneje rumenkasta do rdečkasta kolonija. Na spodnji strani je brezbarvna, rumenkasta do rožnata. Trosonosce (konidiofore) sestavljajo kroglasti do bučkasti bazalni deli in do 20 µm dolgi stržen, večinoma usmerjen »cik – cak«. Konidiji so prozorni, kroglasti, na splošno elipsoidne oblike, ponavadi so velikosti 2 – 3 x 2 – 2,5 µm. Konidiji se oblikujejo v skupinah kot snežne ali bombažne kepice (Rehner, 2005; Rechner in Buckley, 2005, cit. po Zimmermann, 2007).

Gliva *B. bassiana* je najbolj razširjena vrsta svojega rodu. Na splošno je najdena na okuženih žuželkah, tako v zmernih kot tudi v tropskih območjih po vsem svetu. MacLeod (1954, cit. po Zimmermann, 2007) navaja, da je bila *B. bassiana* izolirana iz 63 različnih vrst žuželk zbranih iz različnih krajev po vsej Kanadi. Prav tako so poročali, da so glivo našli v tkivih pljuč 14 glodavcev. Histološke preiskave niso pokazale, da bi gliva povzročila bolezensko stanje v tkivih glodavcev. Bomsch (1980, cit. po Zimmermann, 2007) je navedel pojavnost glive *B. bassiana* v naravi in razširjenost glive v različnih delih sveta, in sicer: Turčija, Slonokoščena obala, Z. Afrika, Centralna Afrika, J. Afrika, Bahami, Nepal, V Sibirija, Nova Zelandija in Japonska. *B. bassiana* je bila izolirana iz površja in notranjosti rastlin. S pomočjo selektivnega gojišča so glivo izolirali iz skorje bresta, iz tal ob osnovi bresta (Doberski in Tribe, 1980) ter iz skorje oz. lubja ameriške vrste belega gabra (*Carpinus caroliniana*) (Bills in Polishook, 1991). Nedavno so raziskave pokazale, da se vrsta pojavlja tudi v živih mejah (Meyling in Eilenberg, 2006). Čeprav glive rodu *Beauveria* nimajo nič skupnega s prostoživečimi glivami v zraku, so glivo *B. bassiana* izolirali tudi iz zraka. V raziskavah biotske raznovrstnosti gliv v zraku v Torinu (Italija), je bila gliva najdena v povprečno 0,2 CFU/m³ zraka v obdobju 10 mesecev/leto (Airaudi in Filipello – Marchisio, 1996, cit. po Zimmermann, 2007).

Naravna gostota glive *B. bassiana* v zraku gozda na Japonskem znaša dnevno $0 - 3,1 \times 10^3$ CFU/m³ (Shimazu in sod., 2002).

2.3 KROG GOSTITELJEV

Gliva *B. bassiana* je vsesplošno razširjena entomopatogena gliva, ki je bila izolirana iz različnih žuželk iz različnih redov (MacLeod, 1954; Leatherdale, 1970; Li, 1988; Goettel in sod., 1990, cit. po Zimmermann, 2007). Leatherdale (1970, cit. po Zimmermann, 2007) iz Velike Britanije je opisal 106 gostiteljev te entomopatogene glive. Gostitelji so: Hemiptera (*Picromerus bidens*, *Anthocoris nemorum*); Coccoidea (*Eulecanium* spp.), Lepidoptera (*Hepialus* spp., *Hypocrita guttata*, *Phytodectra olivacea*, *Otiorhynchus sulcatus*, *Sitona lineatus*, *S. sulcifrons*, *S. macularius*, *S. hispidulus*, *Anthonomus pomorum*, *Hylaster ater*), Hymenoptera (*Lasius fuliginosus*, *Vespula* spp., *Bombus pratorium*), Diptera (*Leria serrata*) in pajki.

Na podlagi svetovno znanih podatkov je Li (1988, cit. po Zimmermann, 2007) zapisal 707 vrst gostiteljev za omenjeno glivo. Gostitelji pripadajo 521 rodovom, 149 družinam v 15 redovih. Poleg tega je ugotovljenih 13 gostiteljskih vrst iz reda Acarina, ki so razdeljene v 7 rodov in 6 družin. Redovi žuželk, v katerih je bila *B. bassiana* opredeljena kot patogena so naslednji: Lepidoptera (metulji), Coleoptera (hrošči), Hymenoptera (kožekrilci), Homoptera (enakokrilci), Hemiptera (polkrilci), Diptera (dvokrilci), Orthoptera (ravnokrilci), Isoptera (termiti), Thysanoptera (resarji), Mantodea (bogomolke), Dermaptera (strigalice), Blattariae (ščurki), Embioptera (nogoprelci). Več kot 100 izolatov glive *B. bassiana* iz številnih žuželk je opisanih in shranjenih v USDA ARS – zbirki entomopatogenih gliv (Goettel, 1990, cit. po Zimmermann, 2007).

Kljub razširjenosti glive *B. bassiana* na številnih členonožcih je znano, da ima večina izolatov glive omejen nabor gostiteljev (Goettel, 1990, cit. po Zimmermann, 2007; Vestergaard, 2003, cit. po Zimmermann, 2007). Pred uporabo je pomembno preučiti virulentnost pri različnih izolatih glive in njihovo primernost za zatiranje izbranih ciljnih vrst žuželk.

2.4 NAČIN OKUŽBE GOSTITELJA IN POTEK BOLEZNI (PATOGENEZA)

Potek oz. posamezne faze okužbe gostitelja, ki jih predstavljata Steinhaus (1949, cit. po Zimmermann, 2007) in Müller – Kögler (1965, cit. po Zimmermann, 2007), so omejeni le na splošni vidik poteka okužbe.

Glive iz rodu *Beauveria* spp. okužijo gostitelja skozi kutikulo. Okužba je sestavljena iz naslednjih stopenj:

1. pritrditev spor na kutikulo (povrhajico),
2. kalitev trosov (konidijev),
3. prodor glive skozi povrhajico,

4. obvladovanje gostiteljskih imunskih obrambnih funkcij in premagovanje gostiteljskega odziva (obrambe),
5. razmnoževanje z delitvijo oz. z oblikovanjem hifnih teles (blastospor) znotraj gostitelja,
6. saprofitsko izraščanje iz mrtvega gostitelja in tvorba novih konidijev.

Pritrditev spor na povrhnjico je možna zaradi hidrofobnosti konidijev kot tudi same povrhnjice. Konidiji vsebujejo hidrofobin - obliko beljakovine, ki je na njihovem površju. Uspešna okužba je odvisna od številnih dejavnikov (dovzetnega gostitelja, povrhnjice gostitelja, okoljskih razmer – optimalna temperatura in vlažnost). Kalitev konidijev je odvisna od lastnosti kutikule (kratkih verig maščobnih kislin, aldehydov, voska, estrov, ketonov in alkoholov, ki imajo antimikrobno delovanje). Povrhnjica gostitelja je lahko prevlečena s snovmi, ki so pomembne za prepoznavanje s strani glive. Te snovi so proste aminokisliline oziroma peptidi in lahko sprožijo pritrditev konidijev glive oziroma njihovo kalitev. Kalitev konidijev glive *B. bassiana* se začne 10 ur po pritrditvi na gostitelja pri temperaturi 20 do 25 °C in se zaključi po 20 urah. Gliva prodre skozi tanjša, nesklerotizirana območja na povrhnjici gostitelja, kot so sklepi, med segmenti/razdelki ali ustnimi deli. Pred prodromom v gostitelja zrastejo iz spor klični mešički, ki tvorijo apresorije in infekcijske hife. Penetracija poteka mehanično ter s pomočjo večjega števila encimov, kot so proteaze, hitinaze in lipaze (Khachatourians, 1998, cit. po Zimmermann, 2007).

Gostiteljev obrambni mehanizem (tvorba encima fenoloksidaze, homocitov in melanizacija) se odzove na vdor glive skozi povrhnjico in začetek okužbe. Povezanost prodirajoče glive in gostiteljskega imunskega sistema je večplasten proces, ki je sestavljen iz številnih celičnih in molekularnih reakcij. Predstavniki rodu *Beauveria* spp. med procesom okužbe tvorijo proteolitične encime in toksine, medtem ko se gostitelji odzovejo s celičnimi obrambnimi reakcijami. Te reakcije so sestavljene iz tvorbe antiglivnih spojin, induciranih proteaznih inhibitorjev in proteinov, ki razstrupljajo glivne strupe v telesu gostitelja (Vilcinskas in Götz, 1999).

Po uspešnem prodoru, gliva začne oblikovati hifna telesa, ki se pasivno razporedijo v hemolimfi. Ti ji omogočajo, da gliva zavzame tkiva gostitelja z obsežno vegetativno rastjo in tvorbo toksinov. Gliva črpa hranilne snovi in telesne maščobe iz telesa gostitelja. Proces se konča s smrtjo gostitelja in s tem se okužba zaključi (Boucias in Pendland, 1998). Inkubacijska doba je odvisna od gostitelja, od razvojne faze v kateri je, temperature in virulentnosti glive. Po gostiteljevi smrti micelij glive v vlažnih razmerah izrašča iz kadavra (trupelca), oblikuje konidiogene celice, sledi sporulacija na površju odmrlega organizma in sproščanje konidijev v okolico. V suhih razmerah, gliva obstane kot micelij znotraj kadavra, kjer tvori konidije (kobilice v Afriki) (Müller-Kögler, 1965 cit. po Zimmermann, 2007; Ekesi, 2001, cit. po Zimmermann, 2007; Ouedraogo in sod., 2003, cit. po Zimmermann, 2007).

2.5 TVORJENJE METABOLITOV/TOKSINOV

Mikroorganizmi, predvsem glive tvorijo veliko različnih spojin ali metabolitov v okviru sekundarnega metabolizma. Ti imajo različno vlogo in delovanje. Vrste iz rodu *Beauveria* spp. tvorijo več toksičnih spojin *in vitro* ter *in vivo*. Večina teh insekticidnih molekul ima majhno molekulsko maso, predvsem ciklični peptidi. Makromolekulski toksini se izločijo med mikozo v hemolimfo (Fuguet in Vey, 2004).

Beauvericin je najbolj pomembna toksična spojina, katero so prvič ugotovili pri *B. bassiana*. Je toksičen, ciklični heksadepsipeptid, ki ga tvori ciklično ponavljajoče zaporedje treh molekul N-metilfenilalanina izmenično s 3 molekulami 2-hidroksisovalerične kisline.

Bassianolid je ciklo-oktadepsipeptid, ki ga tvori *B. bassiana*. Ima antibiotično delovanje (Strasser in sod., 2000).

Bassiakridin je strupen protein, katerega so izolirali iz seva *B. bassiana*, ki okužuje kobilice. Ima specifično delovanje na kobilice in podobnost s hitinom v kvasovkah (Queseda-Moraga in Vey, 2004).

Bassianin je rumeno obarvan nepeptid, ki inhibira eritrocitne membrane ATP-aze (Jeffs in Khatchatourians, 1997, cit. po Zimmermann, 2007).

Oksalna kislina je pomembna pri raztapljanju proteinov v povrhnjici gostitelja.

Med drugimi sekundarnimi metaboliti pri rodu *Beauveria* se pojavljajo še tenellin (rumeno obarvan nepeptid), beauveriolidi in beauverolidi (peptidi s podobno strukturo kot jo imata beauvericin in bassianolid), oosporein (glavni sekundarni metabolit glive *B. brongniartii*) (Vey in sod., 2001, cit. po Zimmermann, 2007).

2.6 VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV

Razmnoževanje in preživetje katerega koli mikroorganizma v okolju je močno povezano s številnimi abiotičnimi in biotičnimi dejavniki. Najpomembnejši abiotični okoljski dejavniki za glive so temperatura, vlaga in ultravijolično sevanje. Ti dejavniki so povezani z učinkovitostjo entomopatogenih gliv v pridelovalnih razmerah (Clerk in Madelin, 1965, cit. po Zimmermann, 2007; Müller-Kögler, 1965, cit. po Zimmermann, 2007; Roberts in Campbell, 1977, cit. po Zimmermann, 2007; Keller in Zimmermann, 1989, cit. po Zimmermann, 2007; Fuxa, 1995, cit. po Zimmermann, 2007).

1. Temperatura (T)

Vpliva na entomopatogeno glivo na naslednje načine: na kalitev in rast ter preživetje glive po smrti gostitelja. Visoke T inaktivirajo glivo preden pride v stik z gostiteljem ali zmanjšajo oz. pospešijo rast v škodljivcu, odvisno od tolerantnosti glive na T. V nasprotju s tem, nizke T zmanjšajo ali celo ustavijo proces kalitve spor in rasti glive ter tako ovirajo ali podaljšajo uspešno okužbo.

Pri glivi *B. bassiana* je optimalna temperatura 23 - 28 °C, minimalna 5 - 10 °C, maksimalna 30 - 38 °C, kar je odvisno tudi od izolata (Müller-Kögler, 1965; Roberts in Campbell, 1977, cit. po Zimmermann, 2007).

2. Vlažnost/ relativna zračna vlaga (RZV)

Je zelo pomemben dejavnik, ki vpliva na učinkovitost in preživetje entomopatogene glive. Za kalitev spor na povrhnjici gostitelja in sporulacijo na mrtvem gostitelju je potrebna visoka vlaga. Razpon relativne zračne vlage za kalitev konidijev je med 92 - 100 % (Walstad in sod., 1970; Hallsworth in Magan, 1999, cit. po Zimmermann, 2007). Kalitev spor se rahlo zmanjša pri 99 % relativni zračni vlagi, medtem ko se kalitev ustavi pri 94 % in rast pri 92 %. Patogeneza v gostiteljih se pojavi pri 60 - 70 % RZV.

3. Ultravijolično UV sevanje

Škodljivi učinki vplivajo na obstojnost mikrobnih agensov. V entomopatogeni glivi inaktivira insekticidno delovanje (Gardner in sod., 1977, cit. po Zimmermann, 2007).

2.7 USODA IN ŠIRJENJE GLIVE *B. bassiana* V OKOLJU

Raziskave o usodi in širjenju glive *B. bassiana* so pomembne v povezavi z njeno ekološko varnostjo (možni potencialni nenamerni učinki na neciljne organizme, onesnaževanje podtalnice).

2.7.1 **Obstojnost v zraku in mobilnost glive *B. bassiana***

Konidiji glive *B. bassiana* so suhi, majhne velikosti in se zlahka prenašajo po zraku. Mobilnost spor je ponavadi vezana na različne žuželke, ki so tako imenovani mehanski prenašalci. Glivo *B. bassiana* uporabljajo v feromonskih vabah, kjer se njeni trosi žuželkam pritrdijo na povrhnjico in ti jih prenesejo v populacijo škodljivcev (Kreutz in sod., 2004).

2.7.2 **Mobilnost in obstojnost v vodi**

Obstajajo različni vidiki mobilnosti in obstojnosti spor glive v vodi: voda se lahko uporablja za dolgotrajno shranjevanje glive v laboratorijskih razmerah; voda je medij, ki omogoča migracijo spor v tla; voda v obliki dežnih kapelj povzroči razpršenost oz. širjenje spor.

2.7.3 **Mobilnost in obstojnost v tleh**

Mobilnost spor glive v tleh je predvsem posledica vode, dežja in talnih členonožcev. Obstojnost je odvisna od številnih abiotičnih in biotičnih dejavnikov. Abiotični dejavniki so: specifične lastnosti tal, temperatura, vlaga in voda ter kemični pripravki. Biotični dejavniki so talni mikroorganizmi in talni členonožci (Keller in Zimmermann, 1989, cit. po Zimmermann, 2007).

Mobilnost

Prenos spor glive v tleh je pomemben dejavnik iz dveh razlogov:

- glivo *Beauveria bassiana* se lahko vnese v tla, kjer pride v stik s talnimi škodljivci, ki se hranijo na koreninskem sistemu gostiteljske rastline;
- glivo se iz površja tal premesti le v območje koreninskega sistema rastline in tako ne more onesnaževati podtalnice, ker jo ne doseže.

Gliva *B. bassiana* se pojavlja v naravnem okolju v tleh po vsem svetu. Nahaja se v različnih obdelovalnih zemljiščih na globini od 0 – 5 cm pa do 20 – 25 cm.

Preizkusi z drugimi vrstami gliv so pokazali, da na migracijo vplivajo talni tipi in različno oblikovane spore (Mietkiewski in sod., 1995, cit. po Zimmermann, 2007)

Obstojnost

Ta lastnost je povezana s fungistazo tal. Izraz opisuje pojav, s katerim žive propagule gliv, ne da bi bile pod vplivom endogenega ali konstitutivnega mirovanja, ne kalijo v nesterilnih tleh, kljub ugodnim temperaturam in vlagi. Hife glive zaostajajo ali prenehajo rasti zaradi neprimernih razmer v tleh oziroma zaradi neprimerne temperature in vlage. Talna fungistaza se pojavlja v naravnih tleh in je dinamičen pojav. Ugotovljena je bila že pred 50 leti (Dobbs in Hinson, 1953, cit. po Zimmermann, 2007). Prve raziskave z ohranjanjem glive *B. bassiana* v tleh so bile narejene leta 1958 (Huber, cit. po Zimmermann, 2007) in kasneje leta 1961 (Wartenberg in Freund, cit. po Zimmermann, 2007). Ugotovili so, da antibiotične snovi, ki jih izločajo talni mikroorganizmi, zavirajo kalitev spor pri glivi *B. bassiana*. Clerk (1969, cit. po Zimmermann, 2007) meni, da so konidiji glive *B. bassiana* podvrženi fungistatičnim vplivom v naravnih tleh. Naravni zaviralci, ki so odgovorni za talno fungistazo so neznani. Kljub temu znanstveniki menijo, da inhibitorne snovi sproščajo talni mikroorganizmi. Clerk (1969, cit. po Zimmermann, 2007) je ugotovil, da konidiji lahko kalijo v nesterilnih tleh ali v tleh, ki so stimulirana z zunanjimi viri hranil in sicer, prisotnost žuželk v tleh vpliva na kalitev konidijev. Kalitev konidijev in rast hif je lahko inhibirana z nesterilnimi vodnimi izvlečki iz tal. Izvlečki iz najglobljih plasti zemlje so manj zaviralni v primerjavi z izvlečki iz plasti humusa – bogatih s hranilnimi snovmi. Inhibicija izvlečkov se je zmanjšala po avtoklaviranju in filtriranju izvlečkov. S tem podatkom lahko potrdimo dejstvo, da humusna tla negativno vplivajo na aktivnost gliv *Beauveria* spp. Rosina (1996, cit. po Zimmermann, 2007) je ugotovil, da tla obogatena s svežim hlevskim gnojem škodujejo glivi *B. bassiana*, medtem ko so tla obogatena s kompostiranim gnojem koristna. Očitno je, da nekateri dejavniki v svežem gnoju zmanjšajo preživelost glive.

Spremljanje mikroorganizmov v okolju je bistvenega pomena ne le za razvoj novih biotičnih agensov, temveč tudi za razumevanje njihovih povezav z bivalnim okoljem, ekološkim vplivom in ocenam varnosti.

2.8 VARNOST PRI UPORABI GLIVE *B. bassiana* KOT BIOTIČNEGA AGENSA

Vsesplošna uporaba entomopatogenih gliv in njihovih produktov v obliki mikroinsekticidov zahteva registracijo pripravkov. V začetnem razvoju biotičnega varstva ni bilo zagotovila o možnih stranskih učinkih ali varnostnih vidikov pri uporabi glive *B. bassiana*. Steinhaus (1957, cit. po Zimmermann, 2007) je bil prvi, ki je sprožil vprašanja o varnosti mikrobnih produktov za človeka, druge vretenčarje in celo poljščine. Ugotovil je, da entomopatogene glive v osnovi niso škodljive za ljudi, živali in rastline. V letih med 1980 in 1990, ko je biotično varstvo prišlo vse bolj v ospredje, so bili varnostni vidiki podrobneje analizirani. Burges (1981, cit. po Zimmermann, 2007) je predstavil glavne principe in smernice za testiranje varnosti entomopatogenov. Menil je, da mora biti povzročitelj bolezni registriran kot varen in hkrati imeti utemeljen dokaz, da je varen oziroma imeti konkretne dokaze, da ni. Zavedati se je potrebno, da razmere brez tveganja ne obstajajo. Pri kemičnih pesticidih kot tudi biotičnih agensih ne moremo nikoli popolnoma potrditi ali zavreči negativne učinke.

Leta 1982 je Hall (cit. po Zimmermann, 2007) objavil prve smernice za registracijo entomopatogenih gliv v obliki svetovalnega dokumenta pod okriljem IOBC. Znotraj EU predpisov, se predpis o varnosti biotičnih agensov nahaja v dokumentu Direktiva 91/414/EEC. Nacionalna registracija mikrobioloških produktov je možna le po obsežnem preizkušanju ter vključitvi mikroorganizmov v Aneks I – smernice. Aneks IIB in Aneks IIIB v Direktivi 91/414/EEC določata zahteve o odmerkih, priloženih v dokument, za vključitev aktivne snovi, ki jo vsebuje mikroorganizem in viruse v Aneksu I k navedeni Direktivi, registracijo varstva rastlinskih produktov, pripravke na osnovi mikroorganizmov in virusov. Navodila za registracijo zahtev mikrobnih pesticidov so objavljena še v OECD (2003, cit. po Zimmermann, 2007).

Področja, ki jih zajemajo varnostni vidiki so:

- Identifikacija *Beauveria* sp.
- Biološke lastnosti *Beauveria* sp. (zgodovina, naravna pojavnost, geografska razširjenost, krog gostiteljev, načini delovanja, tvorba metabolitev, vpliv okoljskih dejavnikov).
- Analitične metode za določevanje in količinsko opredeljevanje ostankov.
- Usoda in obnašanje v okolju (mobilnost in obstojnost v zraku, vodi in v tleh).
- Vplivi na neciljne organizme (neciljni mikroorganizmi, rastline, zemeljski, vodni organizmi, predatorji (plazilci, parazitoidi in neciljni členonožci).
- Vplivi na vretenčarje (ribe, dvoživke, plazilci, ptiči).
- Vplivi na sesalce in na zdravje ljudi.

Na podlagi znanja in testiranja, ki ga premorejo različni znanstveniki spadata vrsti *B. bassiana* in *B. brongniartii* med varni vrsti.

2.9 PRIPRAVKI NA PODLAGI ENTOMOPATOGENE GLIVE *B. bassiana*

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 močno vplivajo na njihovo rast, razvoj in virulentnost ter posledično na njihovo učinkovitost (Celar in sod., 2011).

Tržno registrirani mikoinsekticidi na podlagi glive *B. bassiana* (Butt in sod., 2001; Wraight in sod., 2001; Copping, 2004, cit. po Zimmermann, 2007; Kabaluk in Gazdik, 2005, cit. po Zimmermann 2007; Zimmermann 2005, cit. po Zimmermann, 2007) so:

Bio – Power (Indija), BotaniGard ES (ZDA), BotaniGard 22WP (ZDA), Boverol (Češka), Conidia (Kolumbija), Mycotrol ES (ZDA), Mycotrol – O, Naturalis (Italija), Naturalis – L (Švica in ZDA), Ostrinil (Francija), Proecol (Venezuela), Racer BB (Indija), Trichobass – L in Trichobass – P (Španija).

Naturalis je bioinsekticid na podlagi glive *B. bassiana* (izolat ATCC 74040). Pripravek deluje kot kontaktni insekticid, hkrati pa zavira ovipozicijo pri samicah sadnih muh. S sredstvom se tretira foliarno ali pa se uporablja kot talni insekticid. Sredstvo je v obliki oljne disperzije (OD), s 7,16 % deležem glive (FITO – INFO, 2011).

1. Sredstvo se uporablja (FITO-INFO, 2011):

- a) na breskvah, nektarinah, marelicah in slivah za zatiranje sadne muhe (*Ceratitis capitata*) v 0,12 - 0,15 % koncentraciji (12-15 ml na 10 L vode);
- b) na robidah za zatiranje tripsov (*Frankiniella occidentalis*, *Thrips tabaci*) v odmerku 120-150 ml na 100 L vode oziroma 1,0 - 1,5 L/ha, ter listnih uši (Aphididae) in navadne pršice (*Tetranychus urticae*) v odmerku 80-120 ml na 100 L vode oziroma 0,75-1,0 L/ha;
- c) na jagodah za zatiranje ščitkarjev (Aleyrodidae) v odmerku 80-120 ml na 100 L vode oziroma 0,75 -1,0 L/ha ter za zatiranje resarjev (*Thrips* spp.) v odmerku 120-150 ml na 100 L vode oziroma 1,0 - 1,5L/ha;
- d) na češnjah za zatiranje češnjeve muhe (*Rhagoletis cerasi*) v 0,12 - 0,15 % koncentraciji (12-15 ml na 10 L vode).

2. Sredstvo se uporablja tudi v ekološki pridelavi (FITO-INFO, 2011):

- a) na paradižniku, papriki, jajčevcih, kumarah, bučah, bučkah, melonah in lubenicah za zatiranje strun (Elateridae) v odmerku 80-120 ml na 100 L vode;
- b) na solati, endiviji in radiču za zatiranje strun (Elateridae) v odmerku 80-120 ml na 100 L vode;
- c) na korenju in krompirju za zatiranje strun (Elateridae) v odmerku 400-600 ml na 100 L vode oziroma 2-3 L/ha, tretira se tla ob saditvi (pred zagrinjanjem) ali ob osipavanju;
- d) na lešnikih za zatiranje lešnikarja (*Curculium nucum*) v odmerku 400-600 ml/100 L vode oziroma 2-3 L/ha. Tretira se zemljišče pod grmi leske;

e) na malinah za zatiranje tripsov (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*) v odmerku 120-150 ml na 100 L vode oziroma 1,0 - 1,5 L/ha, ter listnih uši (Aphididae) in navadne pršice (*Tetranychus urticae*) v odmerku 80-120 ml na 100 L vode oziroma 0,75-1,0 L/ha;

f) na jagodah za zatiranje listnih uši (Aphididae) in navadne pršice (*Tetranychus urticae*) v odmerku 80-120 ml na 100 L vode oziroma 0,75-1,0 L/ha.

Izolat glive *B. bassiana* MK 2001 je pri koncentraciji 1×10^7 konidijev/ml zelo patogen za odrasle osebkne travniške stenice *Lygus lineolaris* (Hemiptera). Izolat glive je bil izoliran iz vrst rodu *Lygus* spp. v Kanadi. Izbran je bil zaradi svoje zgodnje sporulacije, obilnega nastajanja konidijev in velike virulentnosti na travniško stenico *Lygus lineolaris* (Kouassi in sod., 2003).

Izolat glive *B. bassiana* 274 in 373 s koncentracijo 10^5 - 10^9 spor/ml so uporabili za zatiranje ličink rumenega riževega zavrtača (*Schirpophaga incertulas* Walker) v laboratorijskih razmerah. Zabeležili so največjo umrljivosti omenjenega škodljivca pri večjih koncentracijah spor/ml, poleg tega pa se je zmanjšal tudi odstotek izleganja jajčec rumenega listnega zavrtača. V primerjavi s kontrolo je izolat 274 bolj patogen za škodljivca (jajčeca, ličinke, bube) kakor izolat 373 (Dhuyo in sod., 2008).

Izolat glive *B. bassiana* GHA je bil manj toleranten za fungicide pri sočasni uporabi v primerjavi s 6 naravnimi izolati iz orehovih nasadov. Bolj učinkovit je postal s selekcijskim pritiskom (Shapiro-Ilan in sod., 2002, cit. po Zou, 2006).

Uporabnost pripravkov na podlagi entomopatogenih gliv je v primerjavi s konvencionalnimi fitofarmaceutskimi pripravki povezana predvsem z njihovo učinkovitostjo in ceno. Prednosti biotičnih pripravkov vključuje varnost ljudi in drugih neciljnih organizmov, zmanjševanje nevarnih ostankov v hrani, povečanje aktivnosti drugih naravnih sovražnikov, ohranjanje oz. povečanje biološke raznolikosti v okolju. Pomembna prednost je tudi, da je nanašanje mogoče s konvencionalno opremo in možnost dolgega shranjevanja pripravkov. Slabosti biotičnih pripravkov so povezane predvsem z odpornostjo ciljnih organizmov na tovrstne pripravke, hitrostjo delovanja, s specifičnim delovanjem (preširok ali preozek spekter ciljnih organizmov, na katere učinkujejo) in visokimi stroški (Lacey in sod., 2001).

Za ustrezno učinkovitost sredstva moramo poiskati tudi primerno formulacijo pripravka, ga aplicirati na rastlino oz. na škodljivce v ustrezni količini in pravočasno. Odločitev o času nanašanja biotičnega pripravka je odvisna predvsem od zastopanosti dovetnega gostitelja v ustreznem razvojnem stadiju, ugodnih okoljskih dejavnikov in mora biti v skladu z drugimi kmetijskimi opravili (namakanje, uporaba fungicidov) (Lacey in sod., 2001).

Z uporabo semiokemikalij (feromonov) v vabah, ki privabljajo predvsem odrasle moške osebkne žuželk lahko ustrezno izboljšamo učinkovitost sredstev. Vabe pred uporabo inokuliramo s sporami gliv. Konidiji glive se pritrdijo na odrasle osebkne žuželk, preden se ta vrne na poljščino ter tako razširijo patogena (glivo) med škodljivce. Ponavadi samec, ki je okužen z glivo, prenese patogena na samico med parjenjem. Takšen način

samorazširjenja glive je zelo učinkovita metoda, predvsem ko je v vabi nameščen ciljno specifičen feromon. Koristi te metode so: je vrstno specifična, sama naprava je enostavno sestavljena in vzdrževana, okužene žuželke se vrnejo v njihove habitate in tam širijo patogena (glivo) (Vega in sod., 2000, cit. po Baverstock in sod., 2010; Yasuda, 1999, cit. po Baverstock in sod., 2010).

V ta namen se uporabljajo tudi koristni organizmi kot so čmrlji in čebele. Čmrlj *Bombus impatiens* je prenašalec glive *B. bassiana* v rastlinjakih, kjer so paprike napadene s populacijo cvetličnega resarja (*Frankliniella occidentalis*) in stenic (Kapongo in sod., 2008, cit. po Baverstock in sod., 2010; Carreck in sod., 2007, cit. po Baverstock in sod., 2010). Carreck (2007, cit. po Baverstock in sod., 2010) je ugotovil, da so čebele uporabne kot vektor glive *Metarhizium* sp. v poljsko populacijo repičarja *Meligethes aeneus* F. Odmerek konidijev se mora optimizirati na maksimalno okužbo škodljivca ter hkrati minimizirati smrtnost samega vektorja.

2.10 FITOFARMACEVTSKA SREDSTVA KOT NAČIN KEMIČNEGA VARSTVA RASTLIN

Fitofarmaceutska sredstva, sredstva za varstvo rastlin ali pesticidi so spojine, ki jih uporabljamo za zatiranje škodljivcev rastlin, mikroorganizmov, ki na njih povzročajo bolezni in plevelov. Po kemični sestavi so FFS anorganske ali organske spojine.

Glede na vrsto organizmov, ki jih FFS zatirajo, le – ta v grobem delimo na: baktericide (zatiranje bakterij), fungicide (zatiranje gliv), insekticide (zatiranje žuželk), akaricide (zatiranje pršic), herbicide (za zatiranje plevelov oz. v širšem smislu neželenih snovi), nematicide (za zatiranje ogorčic ali nematod), limacide (za zatiranje polžev), rodenticide (za zatiranje glodavcev).

Večina aktivnih snovi (učinkovin) v FFS je biotično močno aktivnih. Aktivne snovi ponavadi 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 dodajo razne (neaktivne) snovi, kot so nosilci, topila, emulgatorji, močila in barve (Celar, 2006).

Delitev fungicidov v skupine:

1. Anorganski fungicidi

Pripravki na podlagi bakra (preventivna uporaba)

Pripravki na podlagi žvepla (preventivna in kurativna uporaba)

2. Organski fungicidi (preventivni – kontaktni)

Prizadenejo procese, ki so namenjeni pridobivanju energije v organizmih; problematični so z vidika toksičnosti; ovirajo številne encime; nekateri reagirajo z encimi, ki vsebujejo kovine in tvorijo z njimi kompleksne spojine (Celar, 2006).

Skupine:

Organske kositrove spojine

Ditiokarbamati

Dikarboksimidne spojine

Strobilurini

Ftalimidne spojine

Ostale aktivne snovi

3. Organski fungicidi (sistemični – kurativni)

Rastlinski organi vpijejo aktivno snov, ta se prenese nespremenjena ali v obliki metabolita na večjo ali manjšo razdaljo znotraj rastline. Med aktivnimi snovmi obstajajo razlike v mobilnosti, ki izhajajo iz njihove kemijske strukture ali rastlinske vrste.

Skupine:

Derivati benzimidazola in tiofanata

Triazolske spojine

Spiroksanimi

Imidazolske spojine

Pirimidinske spojine

Inhibitorji sinteze (ergo)sterola

Karbamati

Acilalaninske spojine (fenilamidi)

Morfolinske in piperazinske spojine

Biofungicidi

Amidi akrilne kisline

Kinolini

Večina fungicidov deluje fungistatično (zavirajo rast glive), do smrtnih učinkov pride le v primerih, ko je gliva dolgo časa izpostavljena aktivni snovi ali pa če hkrati pride tudi do obrambnih reakcij same rastline.

Fungicidi morajo biti selektivni, zato da bi se izognili fitotoksičnim učinkom. Imeti morajo majhno toksičnost za sesalce, ribe, čebele in druge neškodljive organizme v ekosistemu (Celar, 2006).

3 MATERIAL IN METODE DE LA

V laboratorijskem poskusu smo uporabili entomopatogeno glivo *B. bassiana*, ki smo jo izolirali iz pripravka Naturalis (INTRACHEM Bio Italia S.p.A., distributer za SLO Karsia d.o.o). Za hranljivo gojišče smo uporabili trdni krompirjev dekstrozni agar – PDA (Merck).

Izolirano glivo smo precepili na trdno gojišče v petrijevke (\varnothing 90 x 15 mm), jo inkubirali 14 dni v rastni komori (Kambič) pri temperaturi 25 °C. Poskus smo nastavili v laboratoriju v brezprašni komori pod sterilnimi razmerami. Ravno tako je bil razkužen ves pribor (skalpeli, pincete) ter delovna površina. Preučevali smo vpliv dveh fungicidnih pripravkov, Antracol WG 70 z aktivno snovjo propineb (Bayer CropScience) in Shirlan 500 SC z aktivno snovjo fluazinam (ISK Biosciences Europe S.A., Syngenta), na rast micelija glive *B. bassiana* pri štirih različnih odmerkih fungicidov (100 %, 75 %, 50 %, in 25 % priporočenega odmerka) in dveh temperaturah (15 °C in 25 °C) ter 60 % zračni vlagi. Kontrolno obravnavanje je bilo brez dodanega fungicida pri obeh temperaturah. Vsa obravnavanja so imela 6 ponovitev. Pri izbiri priporočenega odmerka s strani proizvajalca smo se pri obeh pripravkih odločili za odmerke, ki so priporočeni za uporabo v krompirju, in sicer pri pripravku Antracol smo uporabili odmerek 2,5 kg/ha oz. 0,4 l/ha pri pripravku Shirlan pri enotni porabi vode 1000 l/ha. Agarne plošče s pripravkoma Antracol in Shirlan z nacepljeno glivo *B. bassiana* smo inkubirali 14 dni v rastni komori pri 60 % zračni vlagi ter na dveh različnih temperaturah (15 in 25 °C).

3.1 PRIPRAVA GOJIŠČA

PDA gojišče smo si pripravili po navodilih proizvajalca. V steklenico z 1 l destilirane vode smo zamešali 39 g PDA in jo segrevali v vodni kopeli na 140 °C, dokler se agar ni popolnoma raztopil. Pripravili smo si 10 erlenmajeric z magnetnimi mešali v katere smo zlili po 100 ml gojišča. Odprtine erlenmajeric smo pokrili z dvojno alufolijo in jih skupaj z erlenmajerico s 50 ml destilirane vode 20 minut avtoklavirali pri temperaturi 120 °C in tlaku 1,2 atm. Skupaj z njimi smo sterilizirali tudi nastavke (tipse) za pipete različnih volumnov. Po avtoklaviranju smo gojišče ohladili na 50-55 °C in mu dodali ustrezno količino pripravka, da smo dobili želeno koncentracijo fungicida. Pri pripravku Antracol smo pripravili založno raztopino, kjer smo v erlenmajerico s 50 ml sterilne destilirane vode zamešali 12,5 g Antracola. Iz založne raztopine Antracola smo odpipetirali po 1 ml (100 % odmerek), 0,75 ml (75 %), 0,50 ml (50 %) in 0,25 ml (25 %) v posamezne erlenmajerice s po 100 ml PDA. Pred razlivanjem v petrijevke smo gojišče z dodanim pripravkom dobro premešali z magnetnim mešalom ogretim na pri 60 °C in 400-600 obratih. Razlili smo ga v 6 sterilnih petrijevok ter ga pustili, da se strdi. Iz dveh pripravljenih erlenmajeric s 100 ml PDA brez dodanega pripravka, smo pripravili agarne plošče za kontrolo, in sicer po 6 petrijevok za obe temperaturi (15 in 25 °C).

Pripravek Shirlan je v obliki suspenzije, tako da nam ni bilo potrebno pripravljati založne raztopine. Iz pripravka smo odpipetirali 40 μ l (100 % odmerek), 30 μ l (75 %), 20 μ l (50

%), 10 µl (25 %) v preostale 4 erlenmajerice s po 100 ml agarja. Nadaljnji postopek je bil enak kot pri pripravku Antracol.

3.2 NACEPLJANJE GLIVE *B. bassiana*

Uporabili smo 14 dni staro glivo *B. bassiana*, ki je rastle pri temperaturi 25 °C. S plutovrtom premera 5 mm smo micelij glive po robu petrijevok naluknjali ter s skalpelom prenesli košček glive v vsako od zgoraj pripravljenih petrijevok. Vedno smo košček micelija obrnili tako, da je micelij takoj prišel v neposredni stik z gojiščem. Po nacepljanju smo petrijevke zatesnili s parafilmom, da smo agarne plošče zaščitili pred izhlapevanjem vode in morebitnimi kontaminacijami. Pripravljena gojišča smo dali v rastni komori s temperaturama 15 °C in 25 °C pri 60 % zračni vlagi za 14 dni.

3.3 MERITVE IN OBDELAVA PODATKOV

Prirast micelija glive *B. bassiana* smo ugotavljali po 7 in 14 dneh, tako da smo izmerili premer micelija po dolžini in širini ter občrtali zunanji rob micelija. Po 14 dneh smo vsa obravnavanja skenirali ter jim določili površino z računalniškim programom Nis Elements BR 2.30 (Nikon Instruments Inc., ZDA). Zbrane podatke smo uredili tabelarično in grafično v programu Excel ter opravili statistično analizo s pomočjo programa Statgraphics Plus (Student-Newman-Keuls test pri 5 % tveganju). Fungicida Antracol in Shirlan smo razvrstili glede na inhibicijo rasti glive *B. bassiana* po stopnji škodljivosti na organizem. Zgledovali smo se po stopnjah škodljivosti, ki so jih uporabili v raziskavah Sterk in sod., leta 2002. Stopnje škodljivosti na organizem 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 naslednji formuli:

$$I(\%) = \frac{K - F}{K} \cdot 100 \quad \dots (1)$$

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

3.4 OPIS KEMIČNIH AKTIVNIH SNOVI DODANIH V GOJIŠČE

3.4.1 Propineb (Antracol WG 70)

Je preventivni kontaktni foliarni fungicid iz skupine ditiokarbamatov. V kemičnem pripravku Antracol predstavlja 70 % vsebovane aktivne snovi. Na trgu ga je mogoče dobiti v dveh oblikah: močljiva zrnca WG in močljiv prašek WP. V našem primeru smo uporabili močljiva zrnca WG.

Fungicid se uporablja za naslednje bolezni (FITO-INFO, 2011):

- na trti za pridelavo vinskega in namiznega grozdja za zatiranje:
- peronospore vinske trte (*Plasmopara viticola*),
- črne pegavosti vinske trte (*Phomopsis viticola*),
- na jablanah in hruškah za zatiranje škrlupa (*Venturia* spp.),
- na paradižniku v zaščiteneh prostorih ali na prostem za zatiranje paradižnikove plesni (*Phytophthora infestans*) in črne listne pegavosti krompirja na paradižniku (*Alternaria solani*),
- na kumarah, melonah in lubenicah za zatiranje kumarne plesni (*Pseudoperonospora cubensis*) in kumarne ožiga (*Colletotrichum lagenarium*),
- na krompirju za zatiranje krompirjeve plesni (*Phytophthora infestans*) in črne listne pegavosti krompirja (*Alternaria solani*),
- na tobaku za zatiranje tobakove plesni (*Peronospora tabacina*),
- na nageljnih za zatiranje nageljnovre rje (*Uromyces dianthi*).

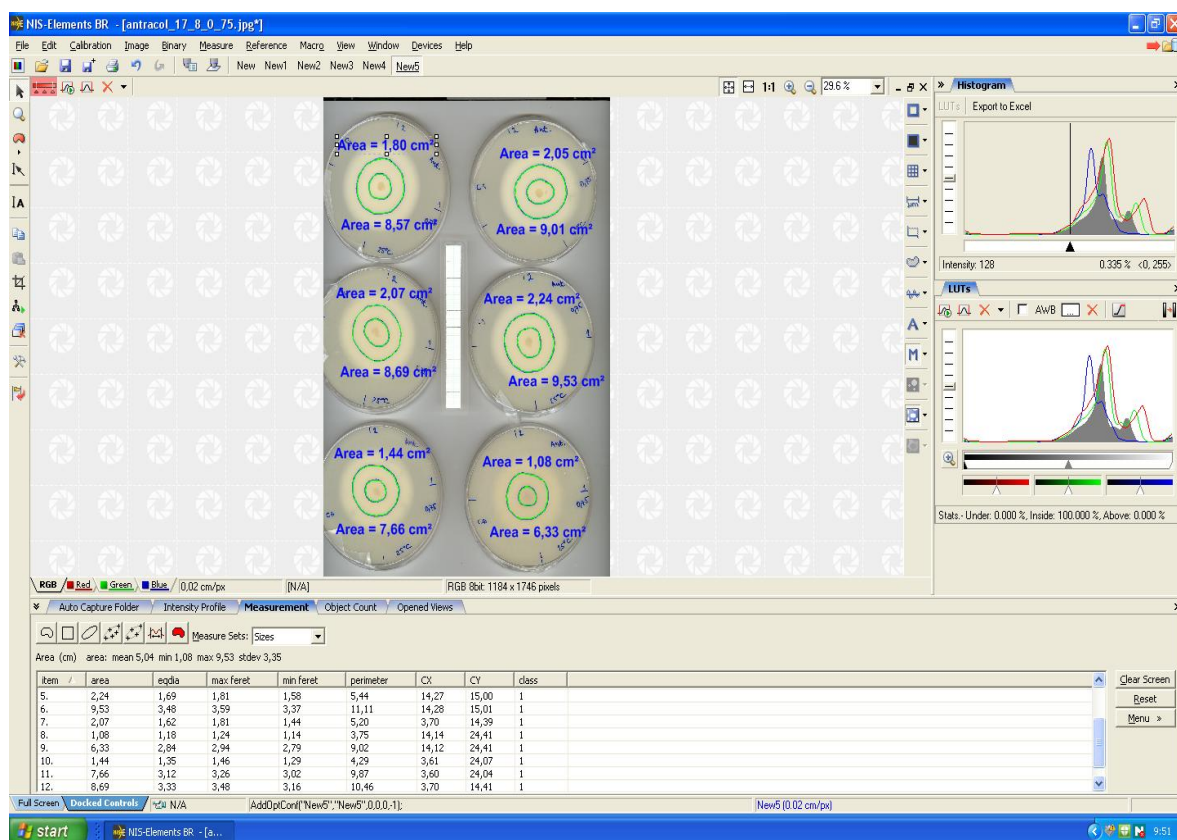
Pripravek Antracol WG 70 se ne sme mešati s sredstvi, ki reagirajo alkalno ali izrazito kislo. Mešanice z alkalnimi sredstvi (npr. bakreno-apnena brozga) je potrebno porabiti takoj. Ob upoštevanju predpisanega odmerka in pravilne uporabe, pripravek ni fitotoksičen za omenjene rastline (FITO-INFO, 2011).

3.4.2 Fluazinam (Shirlan 500 SC)

Fungicid se uporablja za zatiranje krompirjeve plesni (*Phytophthora infestans*) in črne listne pegavosti krompirja (*Alternaria solani*). Priporočeni odmerek za uporabo je 0,3 – 0,4 l/ha. Delež fluazinama v pripravku je 50 %. Na isti površini se lahko pripravek uporabi največkrat 8 krat v eni rastni sezoni. V primeru škropljenja z manjšim odmerkom razmak med škropljenji ne sme biti daljši od 7 - 10 dni, kar je odvisno od vremenskih razmer. Fluazinam ima širok spekter delovanja, deluje predvsem na energijski metabolizem gliv. Spada v pirimidinsko skupino kemičnih pripravkov. Je kontaktni in preventivni fungicid (FITO-INFO, 2011).

4 REZULTATI

Kontrolni obravnavanji (gojišči brez fungicida) sta bili namenjeni za primerjavo v kolikšni meri posamezna fungicida Antracol in Shirlan zavirata rast in razvoj glive pri obeh temperaturah (25, 15 °C). Površino micelija glive *B. bassiana* smo izmerili pri posameznih obravnavanjih v 6 ponovitvah po enem tednu in 14 dneh pri omenjenih temperaturah z računalniškim programom Nis Elements BR 2.30 (slika 2). Iz pridobljenih izmerjenih površin smo izračunali povprečja površin in v primerjavi s kontrolnim povprečjem izrazili inhibicijo rasti glive *B. bassiana*.



Slika 2: Merjenje površin v programu Nis Elements BR 2.30 (foto: Špela Sekne, 2011)

Preglednica 1: Povprečna površina micelija in pripadajoči odstotek inhibicije rasti micelija glive *B. bassiana* pri različnih odmerkih fungicidov (Shirlan, Antracol) in kontroli pri temperaturi 25 °C po 7 dneh (lab. na Katedri za fitomedicino, 2010)

Obravnavanje	Temperatura (°C)	Odmerek (%)	Povprečje P1 (cm ²)	Inhibicija 1 (%)	Stopnja* škodljivosti
Kontrola	25	0	6,16	0	
Shirlan	25	100	1,33	78,5	4
Shirlan	25	75	1,36	77,9	4
Shirlan	25	50	0,94	84,7	4
Shirlan	25	25	1,55	74,8	3
Antracol	25	100	1,15	81,3	4
Antracol	25	75	1,56	74,7	3
Antracol	25	50	1,5	75,6	3
Antracol	25	25	1,86	69,8	3

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

Po 7 dneh pri 25 °C je bila povprečna površina micelija pri kontrolnem obravnavanju brez dodanega fungicida 6,16 cm² (preglednica 1). Pri obravnavanju, kjer smo dodali v hranljivo gojišče fungicid Shirlan, je pri 100 % priporočenem odmerku povprečna površina micelija glive 1,33 cm² oz. je inhibicija prirasta micelija 78,5 %. Pri 75 % odmerku fungicida je bila povprečna površina 1,36 cm² oz. je inhibicija prirasta 77,9 %. Pri 50 % odmerku je bila povprečna površina 0,94 cm² oz. je inhibicija prirasta 84,7 %. Pri 25 % odmerku je bila povprečna površina 1,55 cm² oz. je inhibicija prirasta micelija 74,8 %. Pri obravnavanju, kjer smo uporabili fungicid Antracol v 100 % priporočenem odmerku, je bila povprečna površina micelija 1,15 cm² oz. inhibicija 81,3 %. Pri dodanih 75 % polnega odmerka je povprečna površina micelija 1,56 cm² oz. 74,7 % inhibicija. Pri 50 % odmerku je povprečna površina micelija 1,5 cm² oz. 75,6 % inhibicija. Pri najmanjšem 25 % odmerku je povprečna površina micelija 1,86 cm² oz. 69,8 % inhibicija.

Po 14 dneh smo ponovno izmerili priraste glive *B. bassiana* pri temperaturi 25 °C in izračunali povprečja površin in pripadajoč odstotek inhibicije rasti (preglednica 2). Pri kontrolnem obravnavanju je bila povprečna površina micelija glive 23,04 cm². Pri obravnavanju s fungicidom Shirlan so bila povprečja površin micelija in pripadajoče inhibicije rasti glive naslednja: 2,92 cm² in 87,3 % inhibicija rasti glive pri 100 % priporočenem odmerku, 3,14 cm² in 86,4 % inhibicija rasti pri 75 % odmerku, 2,42 cm² in 89,5 % inhibicija pri 50 % odmerku ter 4,02 cm² in 82,6 % inhibicija pri 25 % priporočenega odmerka. Pri obravnavanju s fungicidom Antracol so bila naslednja povprečja površin micelija in pripadajoče inhibicije rasti: 6,55 cm² in 71,6 % inhibicija

rasti glive pri 100 % priporočenem odmerku, 7,92 cm² in 65,6 % inhibicija pri 75 % odmerku, 8,55 cm² in 62,9 % inhibicija pri 50 % odmerku ter 10,83 cm² in 52,9 % inhibicija pri 25 % polnega odmerka.

Preglednica 2: Povprečna površina micelija in pripadajoči odstotek inhibicije rasti micelija glive *B. bassiana* pri različnih odmerkih fungicidov (Shirlan, Antracol) in kontroli pri temperaturi 25 °C po 14 dneh (lab. na Katedri za fitomedicino, 2010)

Obravnavanje	Temperatura (°C)	Odmerek (%)	Povprečje P2 (cm ²)	Inhibicija 2 (%)	Stopnja* škodljivosti
Kontrola	25	0	23,038	0	
Shirlan	25	100	2,92	87,3	4
Shirlan	25	75	3,14	86,4	4
Shirlan	25	50	2,42	88,7	4
Shirlan	25	25	4,015	82,6	4
Antracol	25	100	6,55	71,6	3
Antracol	25	75	7,92	65,6	3
Antracol	25	50	8,55	62,9	3
Antracol	25	25	10,83	52,9	3

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

Po enem tednu in pri temperaturi 15 °C je bila povprečna površina micelija pri kontrolnem obravnavanju 2,89 cm² (preglednica 3). Pri obravnavanju z dodanim fungicidom Shirlan je bila pri 100 % priporočenem odmerku povprečna površina micelija 0,86 cm² oz. 70,2 % inhibicija. Pri 75 % odmerku je bila površina micelija 0,81 cm² oz. 71,8 % inhibicija. Ob dodanem 50 % odmerku fungicida je bila povprečna površina micelija 0,84 cm² oz. 70,9 % inhibicija. Pri najmanjšem odmerku (25 %) je bila povprečna površina micelija 1,03 cm² oz. 64,3 % inhibicija rasti glive. Obravnavanje pri katerem smo v hranljivo gojišče dodali fungicid Antracol v 100 % priporočenem odmerku, je bila povprečna površina micelija 0,58 cm² oz. 80,1 % inhibicija rasti micelija glive. Pri 75 % odmerku je bila povprečna površina micelija 0,99 cm² oz. 65,9 % inhibicija. Pri 50 % odmerku je bila povprečna površina micelija 0,98 cm² oz. 66,3 % inhibicija. Pri 25 % odmerku je bila povprečna površina micelija 0,99 cm² oz. 65,9 % inhibicija.

Preglednica 3: Povprečna površina micelija in pripadajoči odstotek inhibicije rasti micelija glive *B. bassiana* pri različnih odmerkih fungicidov (Shirlan, Antracol) in kontroli pri temperaturi 15 °C po 7 dneh (lab. na Katedri za fitomedicino, 2010)

Obravnavanje	Temperatura (°C)	Odmerek (%)	Povprečje P1 (cm ²)	Inhibicija 1 (%)	Stopnja* škodljivosti
Kontrola	15	0	2,89	0	
Shirlan	15	100	0,86	70,2	3
Shirlan	15	75	0,81	71,8	3
Shirlan	15	50	0,84	70,9	3
Shirlan	15	25	1,03	64,3	3
Antracol	15	100	0,58	80,1	4
Antracol	15	75	0,99	65,9	3
Antracol	15	50	0,98	66,3	3
Antracol	15	25	0,99	65,9	3

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

Površine micelija glive *B. bassiana* smo izmerili še po 14 dneh pri temperaturi 15 °C (preglednica 4). Povprečna površina micelija pri kontrolnem obravnavanju je bila 12,52 cm². Pri obravnavanju z dodanim fungicidom Shirlan smo ugotovili naslednje povprečne površine micelija oz. odstotke inhibicije povprečno površino 2,29 cm² oz. 81,7 % inhibicijo pri 100 % priporočenem odmerku, povprečno površino 2,29 cm² oz. 81,8 % inhibicijo pri 75 % odmerku, povprečno površino 2,6 cm² oz. 79,2 % inhibicijo pri 50 % odmerku, povprečno površino 2,96 cm² oz. 76,3 % inhibicijo pri 25 % odmerku. Pri obravnavanju z dodanim fungicidom Antracol smo ugotovili naslednje povprečne površine micelija oz. pripadajoče odstotke inhibicije: 3,71 cm² oz. 70,4 % pri 100 % priporočenem odmerku, 4,87 cm² oz. 61,1 % pri 75 % odmerku, 4,82 cm² oz. 61,5 % pri 50 % odmerku ter 4,88 cm² oz. 61 % inhibicijo pri najnižjem 25 % odmerku.

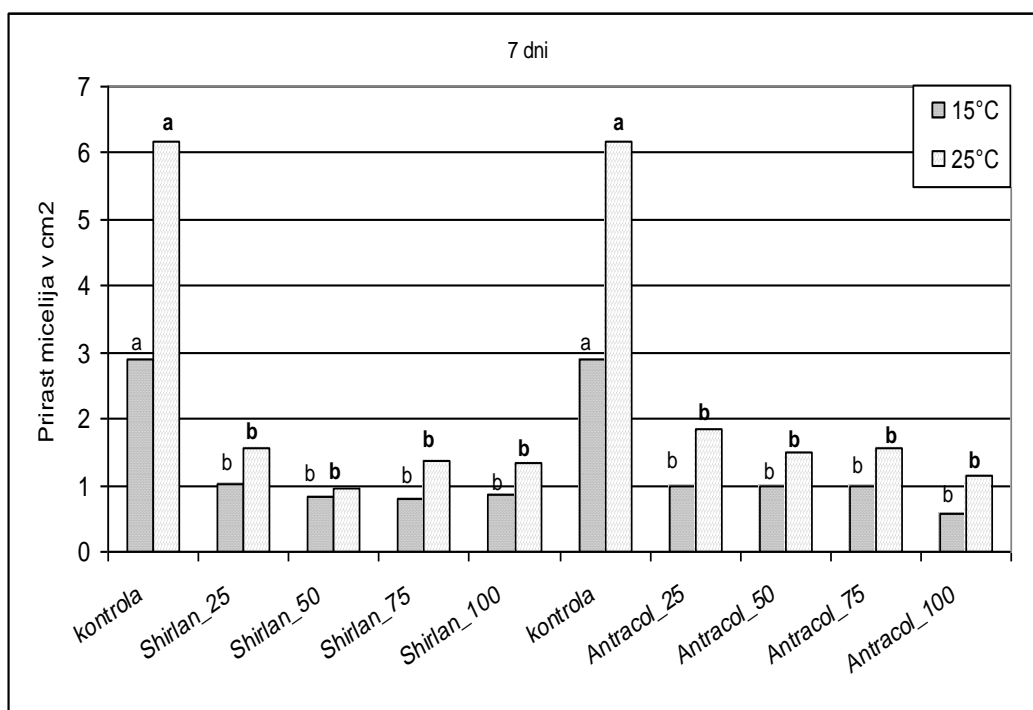
Gliva *B. bassiana* je toploljubna (optimum za razvoj se giblje med 20 in 26 °C), zato je razumljivo, da je pri višji temperaturi bolj vitalna in so povprečni prirasti glive so pri temperaturi 25 °C tudi dvakrat večji, kot pri 15 °C.

Preglednica 4: Povprečna površina micelija in pripadajoči odstotek inhibicije rasti micelija glive *B. bassiana* pri različnih odmerkih fungicidov (Shirlan, Antracol) in kontroli pri temperaturi 15 °C po 14 dneh (lab. na Katedri za fitomdicino, 2010)

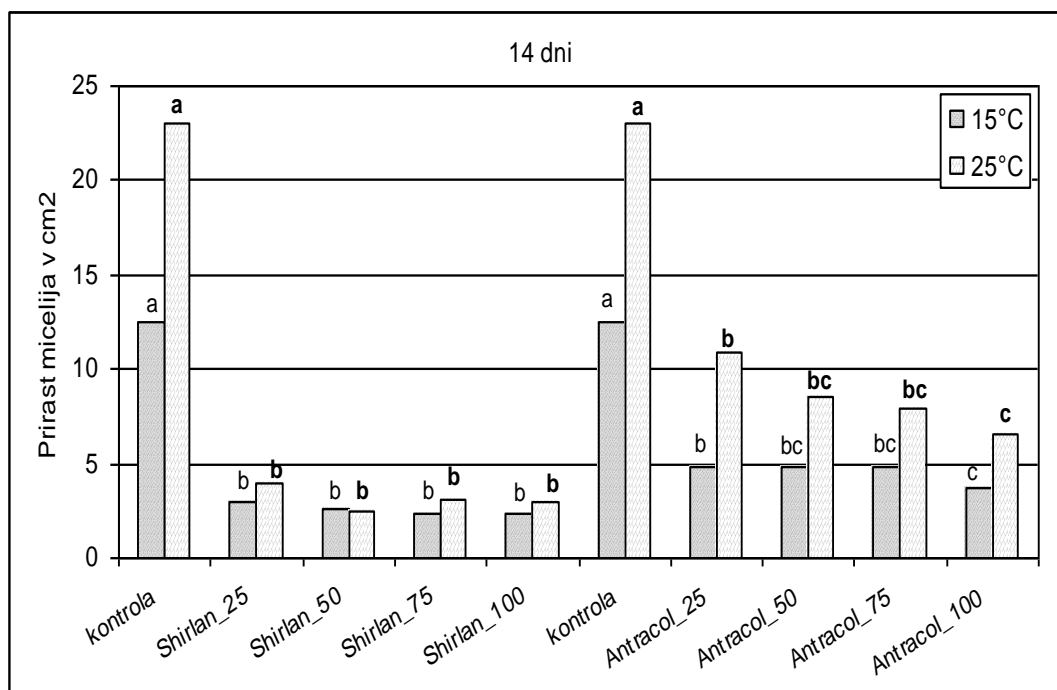
Obravnavanje	Temperatura (°C)	Koncentracija (%)	Povprečje P2 (cm ²)	Inhibicija 2 (%)	Stopnja* škodljivosti
Kontrola	15	0	12,52	0	
Shirlan	15	100	2,29	81,7	4
Shirlan	15	75	2,29	81,7	4
Shirlan	15	50	2,6	79,2	4
Shirlan	15	25	2,96	76,3	4
Antracol	15	100	3,71	70,4	3
Antracol	15	75	4,87	61,1	3
Antracol	15	50	4,82	61,5	3
Antracol	15	25	4,88	61	3

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

Povprečne površine micelija glive *B. bassiana* po enem tednu pri kontroli smo primerjali s povprečnimi površinami glive z dodanimi različnimi koncentracijami fungicidov Shirlan in Antracol pri temperaturah 15 °C in 25 °C (slika 3). Kontrola pri temperaturi 15 °C je bila ista za oba fungicide. Pri fungicidu Shirlan smo s statistično analizo ugotovili, da so povprečne površine micelija v vseh obravnavanjih statistično značilno manjše v primerjavi s kontrolo. Iz slike in statistične analize je razvidno, da ima Shirlan pri vseh preučevanih koncentracijah (25 – 100 %) enak zaviralni učinek. Pri povprečnih površinah micelija, kjer smo v gojišče dodali fungicid Antracol, smo prišli do podobnih rezultatov. Pri vseh koncentracijah se je izkazalo, da ima fungicid Antracol enak statistično značilen inhibicijski učinek v primerjavi s kontrolo. Pri temperaturi 25 °C so bile pri fungicidu Shirlan pri vseh koncentracijah povprečne površine micelija statistično značilno manjše v primerjavi s kontrolo. Med posameznimi dodanimi odmerki fungicida Shirlan ni bilo statistične značilne razlike. Povprečni prirasti micelija so pri različnih odmerkih fungicida Antracol statistično značilno manjši v primerjavi s kontrolo. V vseh obravnavanjih fungicida zavirata rast micelija.

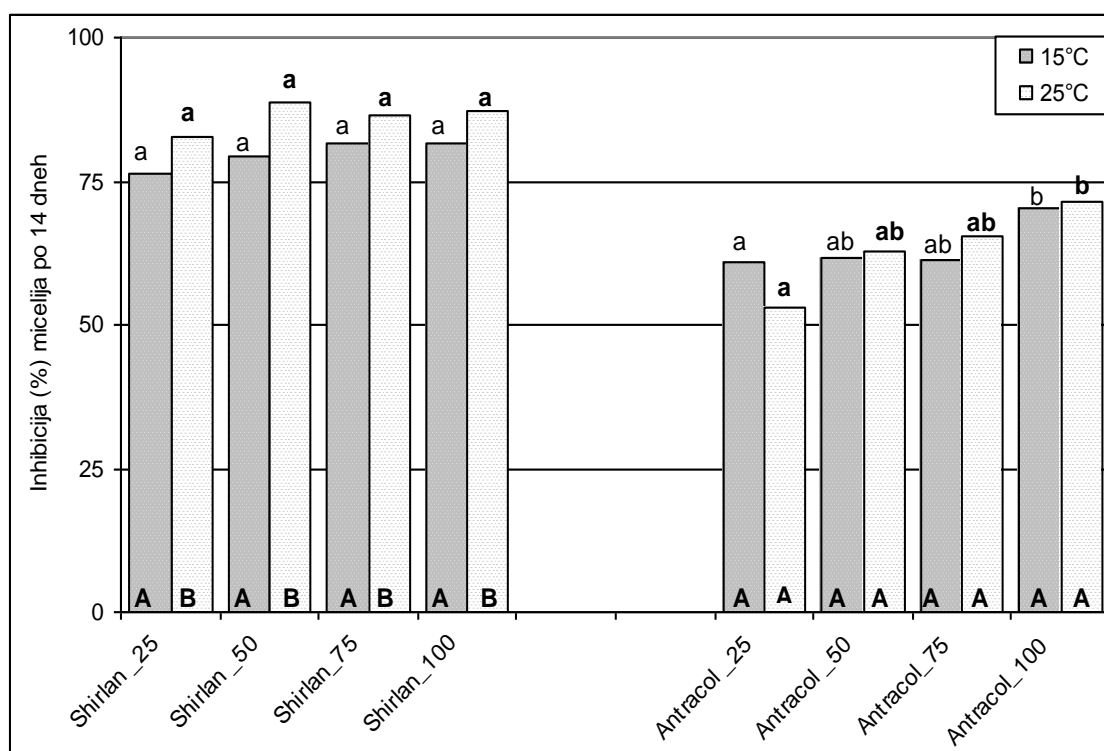


Slika 3: Povprečne površine micelija glive *B. bassiana* pri različnih odmerkih dveh fungicidov po enem tednu pri temperaturi 15 °C in 25 °C ter 60 % r. z. v. (različne črke pomenijo statistično značilne razlike v prirastih micelija pri različnih koncentracijah v okviru enega fungicida; navaden tisk pri 15 °C, krepak tisk pri 25 °C) (lab. na Katedri za fitomedicino, 2010)



Slika 4: Povprečne površine micelija glive *B. bassiana* pri različnih odmerkih dveh fungicidov po 14 dneh pri temperaturi 15 °C in 25 °C ter 60 % r. z. v. (različne črke pomenijo statistično značilne razlike v prirastih micelija pri različnih koncentracijah v okviru enega fungicida; navaden tisk pri 15 °C, krepak tisk pri 25 °C) (lab. na Katedri za fitomedicino, 2010)

Po preteku 14 dni smo v istem poskusu dobili naslednje rezultate (slika 4). Vsi povprečni prirasti micelija pri Shirlanu so statistično značilno manjši v primerjavi s kontrolo. Takšne rezultate smo dobili pri obeh temperaturah. Pri vseh obravnavanih odmerkih fungicida Shirlan je bila rast micelija močno zavrt. Pri pripravku Antracol se je pri obeh temperaturah fungistatičnost zmanjševala z manjšanjem odmerka pripravka v gojišču, vendar minimalno. Statistično značilna razlika je bila le med povprečnima površinama micelija pri 25 in 100 % priporočenega odmerka pripravka, med vmesnimi odmerki pa ne.



Slika 5: Povprečne inhibicije rasti micelija glive *B. bassiana* pri različnih odmerkih fungicidov pri temperaturi 15 °C in 25 °C v odstotkih (lab. na Katedri za fitomedicino) (z različnimi malimi črkami smo označili statistično značilne razlike v prirastih micelija pri istem pripravku in isti temperaturi, le pri različnih odmerkih; z velikimi črkami smo označili statistično značilne razlike v prirastih micelija v okviru posameznega pripravka pri istem odmerku in različnih temperaturah; navaden tisk pri 15 °C, krepki tisk pri 25 °C)

Pri pripravku Shirlan različni odmerki fungicidov ne vplivajo na inhibicijo (slika 5). Razlika v inhibiciji rasti (%) ugotovljeni pri fungicidu Antracol je statistično značilna le med 25 in 100 % odmerkom fungicida pri obeh temperaturah. Odstotki inhibicije micelija pri fungicidu Shirlan so bili statistično značilni med temperaturama pri vseh koncentracijah (25 – 100 %). Pri fungicidu Antracol med temperaturama ne obstajajo statistično značilne razlike pri inhibiciji rasti micelija. Inhibicija je pri obeh pripravkih v korelaciji s količino fungicida v gojišču, pri pripravku Shirlan pa tudi s temperaturo, kjer je pri 25 °C inhibicija statistično značilno večja.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V poskusu smo ugotovili, da imata fungicida Antracol in Shirlan fungistatičen vpliv na rast micelija glive *B. bassiana*. Pripravek Shirlan pri vseh odmerkih (25 - 100 %) zavira rast glive od 76 do 89 %, medtem ko pripravek Antracol pri enakih odmerkih od 52 do 71 %. Pri fungicidu Shirlan se je izkazalo, da ima pri vseh preučevanih odmerkih enak zaviralni učinek, pri Antracolu pa se fungistatičen učinek zmanjšuje z zmanjševanjem količine pripravka v gojišču. Statistično značilna razlika obstaja v rasti micelija pri pripravku Antracol med prirastom micelija pri 25 in 100 % priporočenem odmerku pripravka.

Odstotki inhibicije pri fungicidu Dithane so bili primerljivi z inhibicijo, ki smo jo ugotovili pri fungicidih Shirlan in Antracol pri istih temperaturah. Pri vseh treh fungicidih so bili zaviralni učinki na miceliju glive *B. bassiana* močno izraženi. Pri temperaturi 15 °C je fungicid Dithane inhibiral micelij glive od 73 do 83 %, Shirlan od 76 do 81 %, Antracol od 61 do 70 %. Pri temperaturi 25 °C je fungicid Dithane zaviral rast micelija od 46 do 55 %, Shirlan od 64 do 70 %, Antracol od 65 do 80 %. Povzamemo lahko, da fungicidi neugodno vplivajo na rast micelija glive (neobjavljeni podatki).

Izvedena je bila raziskava, ki je preučevala občutljivost neciljnih členonožcev in koristnih vrst gliv na kemične pripravke. Namen raziskave je bil ugotoviti stranske učinke FFS na koristne organizme (pršice, ogorčice, glive,...), ki se jih uporablja v integrirani pridelavi. V testiranje so vključili 4 entomopatogene glive: *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown in Smith soj Apopka 97, *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas, *Beauveria bassiana* in *Trichoderma harzianum* Tul. soj T39. Pri glivi *B. bassiana* so preučevali 12 fungicidov (kaptan, azoksistrobin, krezoksim-metil, trifloksistrobin, mepanipirim, procimidon, žveplo, tolifluanid, imazalil, pirimetanil, tiram, bitertanol). Pri testiranju so uporabili isto metodo kot je v našem poskusu in jo izvedli v laboratorijskih razmerah. Fungicida kaptan in žveplo sta bila najmanj toksična za glivo. Po stopnji škodljivosti so med najmanj škodljive uvrstili še trifloksistrobin, mepanipirim, tolifluanid. Fungicidi tiram, pirimetanil, procimidon in krezoksim-metil so bolj ali manj uporabni pri sočasnem nanosu z glivo. Insekticidno delovanje glive je manj omejeno, kadar so fungicidi ali gliva aplicirani v časovnem zamiku. Bitertanol, azoksistrobin in imazalil močno inhibirajo rast in razvoj glive in niso primerni za sočasno uporabo z glivo. Večino fungicidov so po stopnji škodljivosti uvrstili v razred 2 (malo škodljivi) in 3 (škodljivi) za koristen organizem. S tem se skladajo tudi naši rezultati pri uporabi fungicida Shirlan in Antracol. Še bolj se pokaže toksičnost posameznih fungicidov, če namesto micelija glive uporabimo njene blastospore ali konidije (Sterk in sod., 2003).

Fungicidi antagonistično in sinergistično vplivajo na škodljivce in posledično ovirajo naraven potek okužbe z glivo *B. bassiana* (Benz, 1987, cit po Kouassi in sod., 2003).

Kouassi in sod. (2003) so ugotovili, da pri sočasni aplikaciji fungicidov metalaksil, mankozeb in bakrov oksid z glivo *B. bassiana*, zmanjšajo njeno insekticidno delovanje.

Menijo, da fungicidi zavirajo kalitev spor na povrhnjici škodljivca. V primeru, ko so fungicide nanesti po nanosu glive (dva ali več dni), učinkovitost glive ni bila prizadeta. Fungicidi nimajo vpliva na patogenost glive v notranjosti gostitelja.

S podobnim pristopom so opravili raziskavo v Iranu, kjer so preučevali vpliv 5 insekticidov (imidakloprid, flufenoksuron, teflubenzuron, endosulfan, amitraz) na rast glive *B. bassiana* (izolat DEBI008) v *in vitro* razmerah. Raziskava temelji na souporabi glive *B. bassiana* s pripravki Confidor (imidakloprid), Cascaid (flufenoksuron), Darton (teflubenzuron), Tiodan (endosulfan) in Mitak (amitraz). Analizirali so vpliv uporabljenih FFS na kalivost konidijev, vegetativno rast in sporulacijo glive *B. bassiana*. Pripravke so testirali v treh koncentracijah (osnovni odmerek - x, $\frac{1}{2}$ x, 2 x). Vsa FFS so zavirala vegetativno rast glive *B. bassiana*. Flufenoksuron je povsem nezdružljiv z glivo, ker povzroči popolno inhibicijo rasti micelija. Pri ostalih insekticidih so ugotovili manjšo inhibicijo rasti, vendar še vedno nezadovoljivo za sočasno uporabo z glivo. Imidakloprid nima negativnega vpliva na glivo *B. bassiana*, tako da ga je možno uporabiti sočasno s glivo tudi v integriranem varstvu rastlin. Insekticidi so vplivali na kalitev spor glive *B. bassiana*, njeno vegetativno rast in sporulacijo (Alizadeh in sod., 2007).

Pomemben vidik preučevanja entomopatogenih gliv v biotičnih pripravkih so predvsem njihovi konidiji. Obstoj konidijev je povezan z agrokemikalijami, okoljskimi dejavniki in kemičnimi sredstvi za varstvo rastlin, s katerimi pridejo v stik v tleh (Benz, 1987, cit. po Alizadeh).

Začetne okužbe z glivami so pogojene s sposobnostjo 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).

Naslednja raziskava temelji na treh fungicidih (klorotalonil, mankozeb, bakrov hidroksid) ki se uporabljajo za zatiranje listnih boleznih na krompirju (*Solanum tuberosum*). Ugotavljali so njihov vpliv na insekticidno učinkovitost in sporulacijo glive *B. bassiana*, kadar se uporabi za biotično varstvo proti koloradskemu hrošču (*Leptinotarsa decemlineata*). Preučevali so neposreden učinek fungicidov na glivo *B. bassiana*, ki povzroča smrtnost koloradskega hrošča ter vpliv nanosa fungicida in glive v časovnem zamiku. Vpliv fungicidov na obstoj konidijev v tleh in na listju krompirja so preučevali v naravnih razmerah. Pri pregledu ličink koloradskega hrošča, so opazili, da je bila bistvena večja smrtnost ličink, ko so bile tretirane z glivo *B. bassiana* v primerjavi s kontrolo. Fungicidi niso imeli specifičnega vpliva na smrtnost ličink na krompirju. V laboratoriju je bila bistveno večja smrtnost ličink v primeru, ko so se hranile s krompirjevimi listi poškopljenimi s fungicidi. Smrtnost ličink, ki jih je povzročila gliva *B. bassiana* se je pokazala le v primeru, ko je bilo listje poškopljeno z bakrovim hidroksidom ali vodo. Pri tretiranju krompirjevih listov s klorotalonilom in mankozebo je bila smrtnost ličink močno povečana ne glede na prisotnost glive *B. bassiana*. Pri poljskem poskusu so ugotovili, da fungicidi ne vplivajo na sporulacijo glive *B. bassiana* na kadavrih (trupelcih) ličink v tleh. Večji delež trupelc, ki ga povzroči gliva, je bilo ugotovljeno na območjih, kjer je bil krompir apliciran z bakrovim hidroksidom ali vodo. Obstoj konidijev v tleh in na krompirjevih listih je večji na območju, kjer je krompir apliciran z bakrovim

hidroksidom ali vodo kot pri apliciranju z mankozebom in klorotalonilom. Bakrov hidroksid je manj škodljiv glivi *B. bassiana* kot mankozeb in klorotalonil (Jaros – Su in sod., 1999).

Roberts in Humber (1981, cit. po Jaros - Su in sod., 1999) sta prikazala, da delovanje glive *B. bassiana* na krompirjevih listih hitro upada s časom od nanosa konidijske suspenzije. Obstočnost glive je pogojena z okoljskimi razmerami, predvsem sončnim UV sevanjem.

Loria in sod. (1983, cit. po Jaros - Su in sod., 1999) so preučevali obstoj konidijev po vnosu fungicidov v agar v laboratorijskih razmerah in nanosu konidijev na krompirjevih listih v poljskem poskusu. Čeprav sta mankozeb in metiram inhibirala obstojnost konidijev na agarnih ploščah v laboratoriju, se je v *in vivo* razmerah, izkazalo, da je kljub uporabi metirama količina konidijev povsem primerljiva s kontrolo. Časovni zamik pri nanosu kemičnih sredstev predstavlja zelo pomemben dejavnik pri obstojnosti konidijev v naravnih razmerah.

5.2 SKLEPI

Preučevana fungicida Antracol in Shirlan negativno vplivata na rast in razvoj glive *B. bassiana*. Pri vseh preučevanih odmerkih (25 – 100 %) močno inhibirata rast in razvoj glive. Pripravek Shirlan pri vseh odmerkih (25 – 100 %) zavira rast glive od 76 do 89 %, medtem ko pripravek Antracol pri enakih odmerkih od 52 do 71 %.

Temperatura ne vpliva na inhibicijo glive temveč le na prirast micelija pri fungicidu Antracol, pri Shirlanu smo ugotovili vpliv temperature na inhibicijo glive *B. bassiana* (slika 5).

Po stopnji škodljivosti jih uvrščamo med rahlo do škodljive fungicide. Fungicida nista primerna za sočasno uporabo z glivo *B. bassiana* v integrirani pridelavi.

Dosedanje tuje raziskave preučevanja različnih fungicidov so pokazale, da v večini primerov zavirajo rast in razvoj biotičnih agensov.

Kljub dobljenim rezultatom se moramo zavedati, da so laboratorijski rezultati le delno primerljivi z dogajanjem v naravnih razmerah, zato je potrebno izvesti tudi poljske poskuse, s katerimi potrdimo ali zavrnamo rezultate laboratorijskih poskusov.

6 POVZETEK

Uporaba kemičnih fitofarmaceutskih sredstev postaja vse bolj sporna s strani okoljevarstvenega, ekološkega in vodovarstvenega vidika. Problematika se nanaša predvsem na neustrezno uporabo kemičnih sredstev. Pri integrirani pridelavi je v ospredju biotično varstvo. Temelj uporabe biotičnih pripravkov so živi, koristni organizmi, ki niso škodljivi neciljnim organizmom. S svojim insekticidnim delovanjem usmrtijo škodljivca, vendar je učinkovitost odvisna tudi od vremenskih dejavnikov. Dosedanje tuje raziskave preučevanja različnih fungicidov so pokazale, da kemične snovi zavirajo v večini primerov rast in razvoj biotičnih agensov. V našem primeru smo se osredotočili na glivo *B. bassiana*. V raziskavi smo preučevali pogosto uporabljena fungicidna pripravka pri nas, Antracol WG 70 (Bayer CropScience) in Shirlan SC (ISK Biosciences Europe S.A., Syngenta) z aktivnima snovema propineb in fluazinam. V tuji literaturi še ni bilo omenjenih raziskav o učinku teh dveh fungicidov na entomopatogeno glivo *B. bassiana*.

V laboratoriju smo *in vitro* preučevali učinek propineba (Antracol WG 70) in fluazinama (Shirlan 500 SC) na rast micelija entomopatogene glive *Beauveria bassiana* (Bals.- Criv.) Vuill. Glivo smo gojili na PDA gojišču z dodatkom dveh fungicidov v različnih koncentracijah (100, 75, 50, 25 in 0 % poljskega odmerka) pri 15 in 25 °C. Prirast micelija glive *B. bassiana* smo ugotavljali po 7 in 14 dneh, tako da smo izmerili premer micelija po dolžini in širini ter občrtali zunanji rob micelija. Po 14 dneh smo vsa obravnavanja skenirali ter jim določili površino z računalniškim programom Nis Elements BR2.30 (Nikon Instruments Inc., ZDA). Izračunali smo tudi inhibicijo/zaviralni učinek fungicidov na glivo. Inhibicija rasti micelija je v korelaciji s količino fungicida v gojišču. Pri višjih koncentracijah fungicidov v gojišču se poveča tudi inhibicija glive.

Laboratorijska raziskava je pokazala negativne učinke fungicidov na podlagi propineba in fluazinama na rast in razvoj glive. Pripravek Shirlan pri poljskih koncentracijah (25 – 100 %) zavira rast glive od 76 do 89 %, medtem ko pripravek Antracol pri enakih koncentracijah od 52 do 71 %. Temperatura ne vpliva na inhibicijo glive temveč le na prirast micelija pri fungicidu Antracol, pri Shirlanu smo ugotovili vpliv temperature na inhibicijo glive *B. bassiana*. Po stopnji škodljivosti jih uvrstimo med zmerno do škodljive fungicide. Fungicida nista primerna za sočasno uporabo z glivo *B. bassiana*.

7 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
- Antracol.
http://www.bayercropscience.si/Fungicidi/Antracol_1/ (10.5.2011)
- Baverstock J., Roy H.E., Pell J. K. 2010. Entomopathogenic fungi and insect behaviour: from unsuspecting hosts to target vectors. *BioControl*, 55: 89-102
- Bills G. F., Polishook J. D. 1991. Microfungi from *Carpinus caroliniana*. *Canadian Journal of Botany*, 69: 1477-1482
- Biotično varstvo. Ur.l. RS št. 62/07
- Boucias D. G., Pendland J. C. 1998. Principles of insect pathology. Boston, Kluwer Academic Publishers: 568 str.
- Butt T. M., Jackson C., Magan N. 2001. Introduction – Fungal biological control agents: Progress, problems and potential. Wallingford, CAB International: 1-8
- Celar F., Kos K., Mesec D., Sekne Š. 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
- Celar F. 2006. Fitopatologija in rastlinska pridelava. Študijsko gradivo za področje varstva rastlin. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: CD - ROM
- Dhuyo A. R., Soomro N. M. 2008. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: *Hyphomycetes*) against the Yellow rice stem borer, *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: *Pyralidae*) under laboratory conditions. *Pakistan Entomology*, 30, 1: 37-42
- Dithane.
<http://www.karsia.si/html/prodajni.php?subKategorijaId=79&vsebinaId=44>
(10.7. 2011)
- Doberski J. W., Tribe H. T. 1980. Isolation of entomopathogenic fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 74: 95-100
- FITO – INFO - Slovenski informacijski sistem za varstvo rastlin.
<http://www.fito-info.si> (10.7. 2011)
- Fluazinam.
<http://www.iskweb.co.jp/products/pdf/fluazinam.pdf> (10.7. 2011)
- Fuguet R., Vey A. 2004. Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria bassiana* spp.: *in vivo* studies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85: 152-167

- Gril T. 2006 Možnosti zatiranja ogrcev poljskega majskega hrošča (*Melolontha melolontha* L., *Coleoptera*, *Scarabaeidae*) z entomopatogeno glivo *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch. Seminarska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta.
http://www.fito-info.si/index.asp?ID=VarOk/BV/BV_5.asp (10.7.2011)
- Jackson A. M., Dunlap A. C., Jaronski S.T. 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*, 55: 129-145
- 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
- Kouassi M., Coderre D., Todorova S.I. 2003. Effects of the timing of applications on the incompatibility of three fungicides and one isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (*Deuteromycotina*). *Journal Applied Entomology*, 127: 421-426
- Kreutz J., Zimmermann G., Vaupel O. 2004. Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* among the spruce bark beetle, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in the laboratory and under field conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 14: 837-848
- 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
- Milevoj L. 2007. Kmetijska entomologija. Splošni del. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 182 str.
- Meyling N. V., Eilenberg J. 2006. Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. *Mycological Research*, 110: 188-195
- Potatobeetle.
http://www.google.si/search?q=beauveria&hl=sl&client=firefox-a&hs=Uya&rls=org.mozilla:sl:official&prmd=imvns&source=Inms&tbnm=isch&ei=lhEGT6udCoKAwaHzLixAQ&sa=X&oi=mode_link&ct=mode&cd=2&ved=0CA8Q_AUoAQ&biw=1024&bih=629 (10.7.2011)
- Pravilnik o biotičnem varstvu rastlin. Ur. l. RS št. 45/06
- Quesada – Moraga E., Vey A. 2004. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycological research* 108: 441-452
- Shah F.A., Ansari M.A., Watkins J., Phelps Z., Cross J., Butt T.M. 2009. Influence of commercial fungicides on the germination, growth and virulence of four species of entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 19, 7: 743-753
- Shimazu M., Sato H., Machara N. 2002. Density of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* Vuillemin (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*) in forest air and soil. *Applied Entomology and Zoology*, 37: 19-26

Shirlan.

http://spletni2.furs.gov.si/FFS/REGSR/Dokumenti%5CDoc_1_SHIRLAN500SC.pdf
(10.7.2011)

Sterk G., Heuts F., Merck N., Bock J. 2003. Sensitivity of non - target arthropods and beneficial fungal species to chemical and biological plant protection products: results of laboratory and semi – field trials. V: 1st International Symposium on Biological Control of Arthropods, Honolulu, Hawaii 14. – 18. januar 2002. United States, Forest Health Technology Enterprise Team, Morgantown, W. Va.: 306-313

Strasser H., Vey A., Butt T. M. 2000. Are there any risk in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology*, 10: 717-735

Uporaba domorodnih in tujerodnih vrst organizmov za biotično varstvo rastlin. Ur.l. RS št. 45/06

Vilcinskas A., Götz P. 1999. Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. *Advances in Parasitology*, 43: 267-313

Wraight S. P., Jackson M. A., de Kock S.L. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. Wallingford, CAB International 253-287

Zakon o zdravstvenem varstvu rastlin. Ur. l. RS št. 62/07

Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17, 5/6: 553-596

Zou G., Ying S.-H., Shen Z.-C., Feng M.-G. 2006. Multi-sited mutations of beta-tubulin are involved in benzimidazole resistance and thermotolerance of fungal biocontrol agent *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology*, 8, 12: 2096-2105

ZAHVALA

Ob zaključku diplomske naloge bi se iskreno zahvalila svojemu mentorju Franciju Aco Celarju za pomoč in napotke pri izvajanju laboratorijskega poskusa, strokovne nasvete in temeljito popravljanje diplomskega dela.

Hvala asistentki Katarini Kos za pomoč v laboratoriju, za strokovne nasvete in popravke v diplomski nalogi.

Posebno bi se rada zahvalila članici komisije doc. dr. Darji Kocjan Ačko in predsedniku prof. dr. Francu Batiču za hiter in temeljit končni pregled diplomskega dela.

Posebno in iz srca se zahvaljujem staršema, ki sta mi omogočila študij, me pri njem ves čas podpirala, spodbujala ter potrpežljivo čakala na končni izdelek diplomske naloge.

Zahvaljujem se fantu Tadeju, ki me je spravljal v dobro voljo in me vzpodbujal v času pisanja diplomske naloge.