

Utjecaj grinja u tlu na entomopatogene nematode

Kelemen, Betina

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:041071>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Betina Kelemen

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Utjecaj grinja u tlu na entomopatogene nematode

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Betina Kelemen

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Utjecaj grinja u tlu na entomopatogene nematode

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Ivana Majić, mentor
2. dr. sc. Ankica Sarajlić, član
3. prof. dr. sc. Emilija Raspudić, član

Osijek, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda, smjer Bilinogojstvo
Betina Kelemen

Završni rad

UTJECAJ GRINJA U TLU NA ENTOMOPATOGENE NEMATODE

Sažetak: Mikrofauna tla je bogata s velikim brojem organizama među kojima su entomopatogene nematode i grinje. Navedeni organizmi su prisutni u svim agroekosustavima. Cilj ovog rada je utvrđivanje prisutnosti entomopatogenih nematoda i grinja u tlu, te njihova identifikacija i interakcija. Uzorci tla su uzeti iz nekoliko agroekosustava kako bi se utvrdilo prisustvo entomopatogenih nematoda i grinja, te je postavljen laboratorijski pokus da se utvrdi postoji li interakcija između dvije vrste entomopatogenih nematoda i grinja. Utvrđene su entomopatogene nematode iz roda *Oscheius* te grinje iz skupine Oribatidae. Vidljiv je trend pada brojnosti nematoda nakon njihove izloženosti grinjama iz skupine Oribatidae. Utvrđena je statistički značajna razlika u brojnosti *Oscheius sp.* zadnjeg dana u odnosu na prvi dan pokusa. Utvrđeno je oko 39% preživjelih ličinki *Oscheius sp.*, dok je oko 62% ličinki *H. bacteriophora* preživjelo nakon izloženosti grinjama iz skupine Oribatida. Rezultati ukazuju da postoji negativna interakcija između entomopatogenih nematoda i grinja iz skupine Oribatida u tlu. Grinje korištene u ovom pokusu su dokazale da su nematofagne i prirodni neprijatelji su entomopatogenih nematoda.

Ključne riječi: *Heterorhabditis*, *Oscheius*, grinje, interakcija
25 stranica, 7 tablica, 14 grafikona i slika, 29 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen: u Knjižnici Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agriculture in Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Plant production

BSc Thesis

EFFECT OF SOIL MITES ON ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES

Summary: Soil microfauna is rich with a wide range of organisms including entomopathogenic nematodes and mites. These organisms are present in all agroecosystems. The aim of this work is to detect and identify entomopathogenic nematodes and mites in the soil, and determine their interaction. Soil samples were taken from several agroecosystems. The laboratory experiment was conducted to determine the interaction between entomopathogenic nematodes (*Oscheius sp.* and *Heterorhabditis bacteriophora*) and soil mites. Entomopathogenic nematodes from the genus *Oscheius* and soil mites from the group Oribatidae were identified from the soil samples. Number of entomopathogenic nematodes decreased after their exposure to the soil mites from the group Oribatidae. Statistically significant difference in the number *Oscheius sp.* was observed between the first and the last day of the experiment. After nematodes were exposed to the mites Oribatida, about 39% of *Oscheius sp.*, and 62% of *H. bacteriophora* larvae have survived. Results indicate that antagonism exists between entomopathogenic nematode EPNs and soil mites from group Oribatida. Mites used in this trial fed on nematodes, and can be considered as their natural enemy.

Keywords: *Heterorhabditis*, *Oscheius*, mites, interaction
25 pages, 7 tables, 14 figures, 29 references

BSc Thesis is archived in Library of Faculty of Agriculture in Osijek and in digital repository of Faculty of Agriculture in Osijek

SADRŽAJ

KRATICE

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Entomopatogene nematode..... | 1 |
| 1.1.1. Rod <i>Heterorhabditis</i> | 3 |
| 1.1.2. Rod <i>Oscheius</i> | 4 |
| 1.2. Grinje u tlu..... | 5 |
| 1.3. Agroekološki uvjeti u Baranji..... | 7 |
| 2. MATERIJAL I METODE RADA..... | 8 |
| 2.1. Uzorkovanje tla..... | 8 |
| 2.2. Uzgoj malih voskovih moljaca (<i>Achroia grisella</i>) | 9 |
| 2.3. Izdvajanje entomopatogenih nematoda iz tla | 9 |
| 2.4. Izdvajanje nematoda iz gusjenica malog voskovog moljca..... | 11 |
| 2.5. Prikupljanje i analiza izdvojenih nematoda..... | 11 |
| 2.6. Izdvajanje grinja iz uzoraka tla..... | 11 |
| 2.7. Analiza tla..... | 11 |
| 2.8. Pokus interakcije entomopatogenih nematoda i grinja..... | 12 |
| 2.9. Statistička analiza podataka..... | 13 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA..... | 14 |
| 3.1. Pozitivni uzorci tla na entomopatogene nematode i grinje..... | 14 |
| 3.2. Identifikacija entomopatogenih nematoda i grinja | 15 |
| 3.3. Interakcija entomopatogenih nematoda i grinja | 17 |
| 4. ZAKLJUČAK..... | 22 |

| | |
|--------------------------|----|
| 5. POPIS LITERATURE..... | 23 |
|--------------------------|----|

KRATICE

EPN – entomopatogene nematode

DL – „dauer“ ličinka

EPPO – European and Mediterranean Plant Protection Organization

1. UVOD

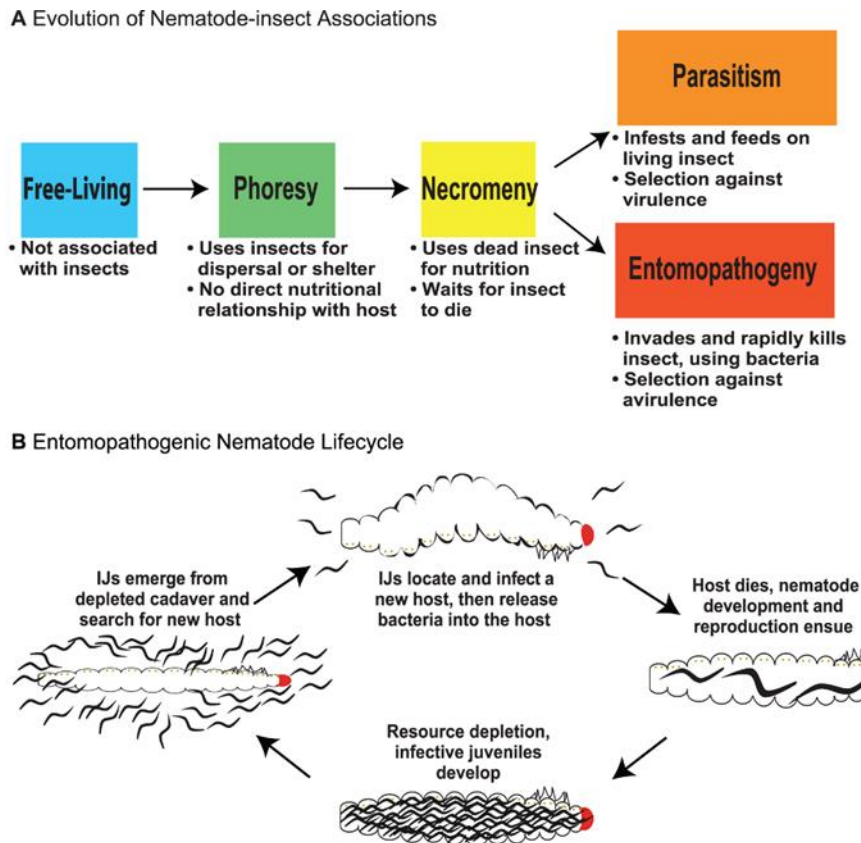
Posljednih nekoliko desetljeća poljoprivrednici intenzivno koriste kemijske pesticide kako bi zaštitili usjev od štetnih organizama. Intenzivno i kontinuirano korištenje kemijskih pesticida dovelo je do narušavanja bioraznolikosti faune tla, te smanjenja brojnosti korisnih kukaca i nematoda. Stoga je Europska Unija donijela niz uredbi s kojima se nastoji povećati upotreba bioloških mjera zaštite biljaka. Mikrofauna tla je bogata s velikim brojem različitih grupa organizama, među kojima su i entomopatogene nematode i grinje. Ovi organizmi su prisutni u svim agroekosustavima. Cilj ovog rada je izdvojiti i identificirati entomopatogene nematode i grinje iz uzoraka tla iz različitih agroekosustava. Nadalje, cilj je utvrditi interakcijski odnos između entomopatogenih nematoda i grinja.

1.1. Entomopatogene nematode

Entomopatogene nematode (grčki *entomon* znači kukac, *patogen* znači uzročnik bolesti) su mikroskopski organizmi koji uzrokuju smrt kukaca. Entomopatogene nematode (EPN) su valjkasti crvi koji žive unutar tijela kukaca, stoga ih nazivaju endoparazitima. One napadaju različite vrste kukaca koji tijekom barem jednog stadija razvoja borave u tlu.

Entomopatogene nematode iz porodice Heterorhabditidae i Steinernematidae koriste se u biološkoj kontroli štetnih kukaca (Gaugler, 2006.). Biološka kontrola podrazumijeva upotrebu prirodnih neprijatelja s ciljem suzbijanja štetnih organizama u poljoprivrednoj proizvodnji. Korištenjem entomopatogenih nematoda smanjuje se potreba za primjenom kemijskih pesticida. Prednost entomopatogenih nematoda u biološkoj kontroli je ta što one aktivno traže domaćina, nisu štetne za čovjeka niti za sisavce, te minimalno utječu na korisne organizme.

Dokazano je da populacija od 250 000 individua entomopatogenih nematoda na kvadratnom metru tla značajno smanjuje populaciju štetnih vrsta kukaca (Campbell i sur., 1998.; Strong i sur., 1996.) (Slika 1.). U porodici Steinernematidae nalazi se rod *Steinernema*, dok je u porodici Heterorhabditidae rod *Heterorhabditis*. Ovim porodicama je zajedničko to što nematode nose u sebi bakterije u infektivnom stadiju koji se još naziva i „dauer“ ličinka (DL). Taj stadij je jedini stadij u kojem nematoda može preživjeti duže vrijeme bez domaćina.



Slika 1. Evolucija međusobnog odnosa nematoda-kukac i životni ciklus entomopatogenih nematoda

(izvor: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002527>)

Nematode mogu tražiti domaćina pasivno čekajući ga i aktivno krećući se u potrazi za domaćinom. Rodovi *Steinernema* i *Heterorhabditis* se razlikuju u načinu razmnožavanja. Vrste iz roda *Heterorhabditis* imaju hermafroditne jedinke te je dovoljna jedna jedinka za uspješno održavanje populacije nematoda. Kod vrsta iz roda *Steinernema* spolovi su razlučeni, te do sada nisu utvrđene hermafroditne jedinke. Infektivna ličinka EPN traži i zaražava domaćina. Nakon ulaska infektivne ličinke u tijelo kukca, ličinke inficiraju domaćina bakterijom iz roda *Xenorhabdus* ili *Photorhabdus*, koji najčešće uzrokuju smrt domaćina u roku od 48 sati. Entomopatogene nematode i bakterije žive u simbiozi, jer nematode bakterijama pružaju sklonište od nepovoljnih uvjeta, a bakterije zauzvrat ubijaju domaćina, te nematodama pružaju hranjive tvari. U uvjetima nedostatka hrane, nematode stvaraju velike populacije infektivnih ličinki s ciljem opstanka vrste. EPN u tlu zadržavaju sposobnost infektivnosti i patogenosti u vremenskom razdoblju od nekoliko tjedana do

nekoliko mjeseci, ovisno o vrsti. Potrebno je najmanje oko sedam dana za razvoj jedne generacije i pojave druge generacije infektivnih ličinki.

1.1.1. Rod *Heterorhabditis*

Nekoliko *Heterorhabditis* vrsta uspješno se koristi u biološkoj kontroli štetnih kukaca kao što su grčice (*Phytopertha horticola*), neke vrste pipa i drugih kukaca. *H. bacteriophora* je prvi puta opisana 1975. godine kao novi rod, odnosno vrsta iz porodice *Rhabditidae* (Poinar, 1975.). Infektivne ličinke *H. bacteriophora* su vektori Gram – negativnih bakterija (*Photorhabdus luminescens*) (Poinar i sur., 1977.). Nematoda ulazi u tijelo kukca kroz njegove prirodne otvore (usta, analni otvor, *stigma*), a nakon što uđe u kukca, zarazi ga bakterijom. Toksini ove bakterije imaju insekticidno djelovanje, te u roku od 24 do 72 sata ubijaju kukca (Slika 2).



Slika 2. Uginuli kukac iz kojeg izlaze nematode iz roda *Heterorhabditis*

(izvor: <http://www.buglogical.com/beneficial-nematodes/150-million-nematodes-mixed-sc-hb-and-sf/>)

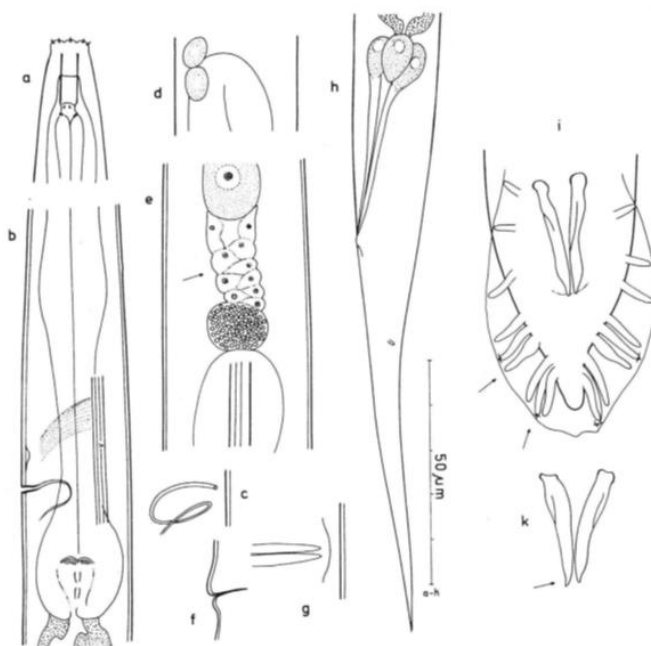
Održavanje populacije *H. bacteriophora* ovisi o prisustvu simbiotske bakterije *P. luminescens*. Životni ciklus *H. bacteriophora* sastoji se od stadija jaja, četiri stadija ličinke, te odraslog stadija. Na temperaturi od 20°C, nematode završe razvoj jedne generacije za 14 dana. *H. bacteriophora* se u tlu nalazi jedino u stadiju infektivne ličinke, svi ostali stadiji razvoja se odvijaju unutar kukca. Isključivo treći stadij infektivne ličinke zaražava kukca.

Ličinke trećeg stadija mogu ući u domaćina kroz analni otvor, usta, traheje, ali mogu ući i hranom. Nematode se hrane i razmnožavaju unutar tijela domaćina, te nakon što se smanji izvor hrane ili nastanu nepovoljni okolišni uvjeti infektivne ličinke izlaze u okolno tlo u potrazi za novim domaćinom. Iz jednog uginulog kukca može izaći stotinu tisuća novih infektivnih ličinki.

Na tržištu su dostupni pripravci sa entomopatogenim nematodama *H. bacteriophora* kao što su NEMAGREEN koji služi za suzbijanje ličinki hrušta (*Melolontha melolontha*) i NEMATOP koji služi za suzbijanje ličinki pipa (*O. sulcatus*). *H. bacteriophora* je uvrštena na EPPO listu o biološkim agentima koji se najčešće primjenjuju u EPPO regiji (http://archives.eppo.int/EPPOStandards/biocontrol_web/bio_list.htm).

1.1.2. Rod *Oscheius*

Oscheius vrste nalazimo u tlu najčešće u rizosferi u DL stadiju. Neke vrste su hermafroditi, pa je za početni uzgoj ovih nematoda dovoljna jedna nematoda. *O. tipulae* je najčešća vrsta (Slika 3), a genetskim analizama utvrđena je sličnost s EPN *Heterorhabditis* i parazitskim nematodama kralježnjaka Strongylida (Blaxter i sur., 1998.). Ostale česte vrste su: *O. dolichura*, *O. gnentheri*, *O. insectivora* i *O. myriophida*. Razvoj jedne generacije *O. tipulae* pri temperaturi od 25°C traje tri dana, a pet do šest dana pri temperaturi od 20°C. Ovaj rod ima četiri stadija ličinke, a kao i ostale entomopatogene nematode ima stadij DL.



Slika 3. *Oscheius tipulae*
(izvor: Sudhaus, 1993.)

Znanstvena istraživanja su pokazala kako *Oscheius* vrste nisu entomopatogene nematode, već strvinari takozvani čistači tla, te entomofilne nematode. U uzorcima tla jednogodišnjih kultura, gdje su utvrđeni rodovi *Heterorhabditis*, *Steinernema* i *Oscheius*, broj entomopatogenih nematoda je bio manji u odnosu na tla sa samo jednim utvrđenim rodom nematoda. Ovi rezultati ukazuju da postoji međusobni antagonizam između entomopatogenih i entomofilnih nematoda (Campos Herrera i sur., 2015.).

Iako se smatraju strvinarima, neke vrste kao što su *O. caroliensis* i *O. onirici* uzrokuju smrt kukaca (Weimin i sur., 2010.; Tornini i sur., 2015.). Rod *Oscheius* se dijeli u tri grupe: Dolichura, Insectivora i Heterorhabditoides (Zhang i sur., 2012.). *Oscheius* vrste u simbiozi su sa simbiotskim bakterijama iz roda *Serratia*, a neke vrste iz ovog roda bakterija su entomopatogene.

1.2. Grinje u tlu

Grinje su beskralježnjaci veličine tijela od 0,1 do 1 mm. Nalazimo ih u svim ekosustavima. Nastanjuju tlo, mora i slatke vode, krošnje i stabla drveća, gnijezda kralježnjaka, mravinjake i dr. Grinje su morfološki gledano najraznolikija grupa člankonožaca u tlu, te je njihova identifikacija vrlo zahtjevna.



Slika 4. Grinje iz skupine Oribatida
(izvor: www.massey.ac.nz/~maminor/mites.html)

Grinje iz skupine Oribatida najčešće se nalaze u gornjim slojevima tla (Slika 4), a često je njihova brojnost usko povezana uz količinu i kvalitetu organske tvari.

Predstavnici skupine Oribatida se često nazivaju pancirnim grinjama zbog čvrstog egzoskeleta. Razvojni ciklus grinja iz skupine Oribatida se sastoji od jaja, ličinke, tri stadija nimfe i odrasle jedinke. Većina odraslih jedinki Oribatida se razmnožavaju više puta tijekom života. Razvojni stadij od jaja do odrasle jedinke može trajati od nekoliko mjeseci do nekoliko godina. Hrane se raspadnutim biljnim materijalima i neophodni su u procesu humifikacije. Mnoge Oribatide su fitofagne, a mogu biti i predatori grinja i drugih beskralježnjaka. Nematofagne grinje se koriste u biološkoj kontroli biljno parazitskih nematoda (Walter i sur, 1993.). Najčešće vrste grinja iz skupine Oribatida dolaze iz dvije porodice: Oribatulidae (Scheloribatidae) i Ceratozetidae.

Muraoka i Ishibashi (1976.) su utvrdili 18 vrsta nematofagnih grinja, od kojih su tri vrste iz skupine Oribatida: *Scheloribatides latipes*, *S. rigidisetosus* i *S. laevigatus*. Također neke vrste iz porodica Sejidae (Slika 5), Trematuridae, Parasitidae, Ascidae i dr. također su predatori nematoda u tlu.



Slika 5. Nematofagna grinja iz porodice Sejidae
(izvor: <http://itp.lucidcentral.org>)

1.3. Agroekološki uvjeti u Baranji

U Istočnoj Slavoniji i Baranji su zastupljena automorfna, hidromorfna, te halomorfna tla (Vidaček i sur., 1997.) . Prosječne godišnje padaline u sjeveroistočnoj Slavoniji i Baranji su oko 600 mm. U Baranji su najzastupljenije oranice i vrtovi, voćnjaci i vinogradi, te livade, pašnjaci i šume. Kukci su značajni za proces kruženja tvari i protoka energije, u održavanju ravnoteže kopnenih i vodenih ekosustava. Agroekološki uvjeti ovog područja pogodni su za veliki broj raznih vrsta kukaca, ali i nematoda. Nematode koje mogu biti obligatni i fakultativni paraziti beskralježnjaka i kralježnjaka te biljaka, saprofagi i predatori također sudjeluju u prirodnom ciklusu kruženja tvari. Abiotski uvjeti kao što su tip tla, vodni režim, onečišćenje tla, obrada tla i drugi antropogeni utjecaji, uvjetuju broj vrsta i populacije entomopatogenih nematoda i grinja u tlu. Također, dostupnost izvora hrane za navedene organizme je vrlo važna. U Baranji, većina poljoprivrednih površina je uključena u sustav intenzivnog rataranja. No, površine u Kopačkom ritu, zatim šume, vinogradi i voćnjaci osiguravaju pogodno područje za održavanje bioraznolikosti kukaca, što je važno da održavanje bioraznolikosti entomopatogenih nematoda i grinja koji se hrane na njima.

2. MATERIJALI I METODE RADA

2.1. Uzorkovanje tla

Uzorci tla su uzeti u svibnju 2016. godine u različitim agroekosustavima (Tablica 1.). Za istraživanje je uzeto sedam uzoraka. Gornji sloj tla je uklonjen motikom, kako bi dobili čiste uzorke tla bez ikakvih biljnih ostataka. Štihačom se uzeo uzorak tla iz zone korijena, te je spremljen u plastične vrećice koje su etiketirane. Na etiketama je napisana: lokacija, kultura, datum i koordinate. Uzorci tla su pojedinačno težili oko 1,5 kg. Uzorci su čuvani u hladnjaku na 4°C.

Tablica 1. Osnovni podaci o uzetim uzorcima tla

| Uzorak broj | Datum uzorkovanja | Lokalitet | Koordinate | Kultura |
|-------------|-------------------|-----------|--------------------------------|--------------------|
| 1. | 28.05.2016. | Bilje | 45°36'10"80 N 18°44'20"62 E | Kupina |
| 2. | 28.05.2016. | Kozjak | 45°40'72"51 N 18°48'80"97 E | Korov (rub kanala) |
| 3. | 28.05.2016. | Tikveš | 45°41'47"9 N 18°50'50"80 E | Šuma |
| 4. | 28.05.2016. | Lug | 45°39'71"98 N 18°46'00"84 E | Strnište |
| 5. | 28.05.2016. | Lug | 45°39'73"4 N 18°46'21"94 E | Povrće |
| 6. | 29.05.2016. | Kopačevo | 45°36'30"68 N 18°47'45"50 E | Povrće |
| 7. | 29.05.2016. | Vardarac | 45°37'37"13 N 18°46'29"53 E | Povrće |

2.2. Uzgoj malih voskovih moljaca (*Achroia grisella*)

Gusjenice malog voskovog moljca uzgojeni su na umjetnoj hrani prema metodi Jones i sur. (2002.) (Slika 6.). Odrasli moljci odlažu jaja na mjestu gdje se hrane ili na postavljeni masni papir. Gusjenice se uzgajaju u plastičnim kutijama koje se drže na mračnom mjestu, na sobnoj temperaturi. Kukuljice i leptiri se odvajaju od ličinki, te se uzgajaju u entomološkim kavezima u sličnim uvjetima kao i ličinke.



Slika 6. Uzgoj voskovih moljaca
(snimila: Kelemen, B., 2016.)

2.3. Izdvajanje entomopatogenih nematoda iz tla

Uzorci tla se ostavljaju u plastičnim vrećicama kako se ne bi isušili. Za izdvajanje entomopatogenih nematoda iz tla koriste se zadnji stadiji gusjenica malog voskovog moljca. U svaki uzorak je stavljeno po pet gusjenica (Slika 7). Uzorci tla se pri tome čuvaju u mraku. Gusjenice se svaki dan tijekom idućih 10 dana provjeravaju da li su žive, zapredene ili uginule (Slika 8). Umjesto uginulih gusjenica se stavljaju žive, a uginule se stavljaju na sušenje. Gusjenice se u označenim Petrijevim zdjelicama na filter papiru suše nekoliko dana. Dok se gusjenice suše, uzorci se ne diraju i čuvaju se u mraku.



Slika 7. Postavljanje gusjenica u uzorke tla
(snimila: Kelemen, B., 2016.)



Slika 8. Prikupljanje uginulih gusjenica iz uzoraka tla
(snimila: Kelemen, B., 2016.)

2.4. Izdvajanje nematoda iz gusjenica malog voskovog moljca

Za izdvajanje nematoda iz gusjenica malog voskovog moljca koristila se *White Trap* metoda. U plitku Petrijevu zdjelicu stavlja se manja Petrijeva zdjelica koja je preokrenuta, na koju se stavlja filter papir s gusjenicama. U plitku Petrijevu zdjelicu se ulijeva destilirana voda. Ako se u gusjenicama nalaze nematode, izaći će u destiliranu vodu.

2.5. Prikupljanje i analiza izdvojenih nematoda

Nekoliko dana nakon postavljanja gusjenica na *White Trap*, nematode će početi izlaziti u destiliranu vodu koja se nalazi u Petrijevoj zdjelici. Ta voda se pregledava pod stereomikroskopom i utvrđuje se prisustvo entomopatogenih nematoda. Ovisno o vrsti, entomopatogene nematode se mogu čuvati u hladnjaku na 4°C u destiliranoj vodi ili hranjivom mediju do 6 mjeseci. Identifikacija nematoda obavljena je metodom lančane reakcije polimerazom (eng. PCR - Polymerase Chain Reaction) na mađarskom institutu NARIC Fruitculture Research Institute. Na Zavodu za zaštitu bilja, Katedri za entomologiju i nematologiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku napravljeni su polutrajni preparati nematoda kako bi se utvrdile morfološke karakteristike nematoda. Pomoću mikroskopske kamere napravljene su slike nematoda te je izmjerena dužina i širina njihovog tijela.

2.6. Izdvajanje grinja iz uzoraka tla

Grinje utvrđene u ovom istraživanju, izdvojile su se istovremeno kada i EPN, te nisu primjenjene druge metode izdvajanja. Grinje su pohranjene u posebnim posudicama za uzgoj kultura u destiliranoj vodi, te su do pokusa čuvane u hladnjaku na 4°C. Identifikacija grinja je utvrđena prema ključu Balogh i Balogh (1992.).

2.7. Analiza tla

Uzorci tla su analizirani na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku, na Zavodu za agroekologiju te je utvrđena tekstura tla.

2.8. Pokus interakcije entomopatogenih nematoda i grinja

Pokus je postavljen u laboratorijskim uvjetima, na sobnoj temperaturi (oko 22°C) i trajao je 14 dana. Postavljena su dva tretmana s četiri ponavljanja: 1. tretman – EPN iz roda *Heterorhabditis* i grinje; 2. tretman – EPN iz roda *Oscheius* i grinje. U svaku Petrijevu zdjelicu u destiliranu vodu je bilo stavljeno 130 entomopatogenih nematoda i 10 grinja. Prvo su kistom izdvojene grinje (Slika 9), a zatim su s automatskom pipetom dodane entomopatogene nematode. Za prebrojavanje nematoda su automatskom pipetom uzete četiri kapljice tekućine od 100 µl u kojima se nalaze nematode. Prosjek brojnosti nematoda u 30 µl tekućine je 30.



Slika 9. Postavljanje pokusa – izdvajanje grinja pomoću kista
(snimila: Kelemen, B., 2016.)

U pokusu su korištene DL nematoda i aktivni stadiji grinja. Prebrojavanjem živih grinja i nematoda pod stereomikroskopom, svaki drugi dan tijekom dva tjedna pokusa utvrđena je njihova brojnost. Petrijeve zdjelice s nematodama i grinjama su se držale na mračnom mjestu, kako bi se simulirali prirodni uvjeti u tlu.



Slika 10. Postavljanje pokusa - inokulacija entomopatogenih nematoda u tretmane s grinjama

(snimila: Kelemen, B., 2016.)

2.9. Statistička analiza podataka

Podaci su analizirani standardnim statističkim metodama (ANOVA), a razlika srednjih vrijednosti je testirana s Tukey's testom (SAS 9.2; SAS Institute, 2007.).

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Pozitivni uzorci tla na entomopatogene nematode i grinje

U tablici 2 su prikazani rezultati prisustva entomopatogenih nematoda i grinja u uzorcima tla. Vidljivo je da su u četiri od sedam uzoraka tla utvrđene entomopatogene nematode, dok je u samo jednom utvrđeno prisustvo grinja. Iako su utvrđene nematode u prirodnom agroekosustavu tj. u tlu uzetom u šumi, većina pozitivnih uzoraka tla bila je uz poljoprivredne kulture. Tekstura uzoraka tla je pjeskovita ili praškasta ilovača, a nematode su utvrđene u oba tipa tla, dok su grinje utvrđene samo na jednom lokalitetu, u Kopačevu u pjeskovitoj ilovači.

Tablica 2.
uzoraka tla na

| Uzorak br. | Kultura | Tip tla | EPN | Grinje | Izolat br. |
|------------|--------------------|--------------------|-----|--------|------------|
| 1 | Kupina | Pjeskovita ilovača | + | - | 1 |
| 2 | Povrće | Pjeskovita ilovača | + | + | 2 |
| 3 | Povrće | Prašasta ilovača | - | - | |
| 4 | Korov (Rub kanala) | Prašasta ilovača | - | - | |
| 5 | Šuma | Prašasta ilovača | + | - | 3 |
| 6 | Strnište | Prašasta ilovača | - | - | |
| 7 | Povrće | Prašasta ilovača | + | - | 4 |

Analiza
prisustvo

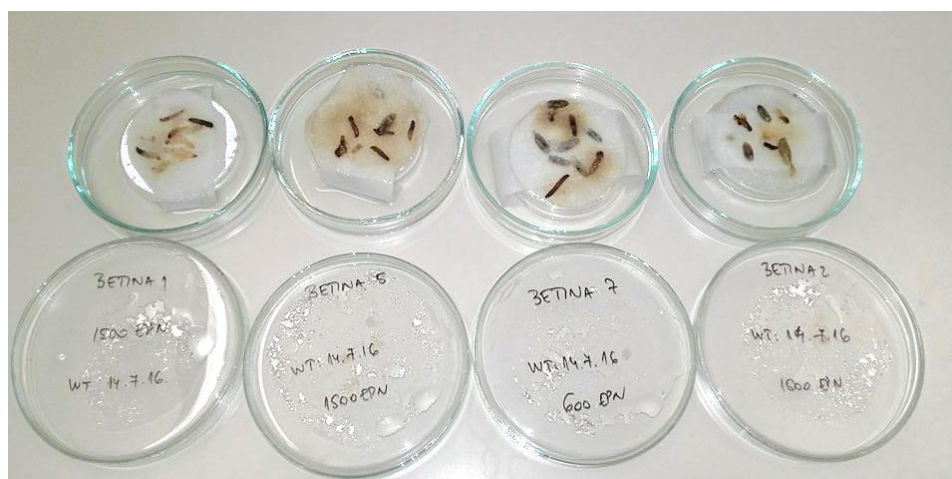
entomopatogenih nematoda i grinja u tlu

3.2. Identifikacija entomopatogenih nematoda i grinja

U ovom istraživanju utvrđena su četiri pozitivna uzorka tla na entomopatogene nematode. Nematode nakon što su izdvojene, uzgajane su na gusjenicama malog voskovog moljca do njihove identifikacije. Identifikacijom lančanih polimeraza utvrđene su nematode iz roda *Oscheius* u svim uzorcima, dok u jednom uzorku nije uspješno obavljena identifikacija nematoda (Tablica 3). No, prema morfološkim osobinama nematoda te izgledu uginulih gusjenica malog voskovog moljca, pretpostavljamo da je također iz roda *Oscheius* (Slika 11).

Tablica 3. Morfološke osobine i utvrđene vrste entomopatogenih nematoda

| Izolat br. | Stadij | Dužina tijela (μm) | Širina tijela (μm) | Vrsta |
|------------|---------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| 1 | Ličinka | 624 | 33 | <i>Oscheius tipulae</i> |
| 2 | Ličinka | 558 | 29 | <i>Oscheius sp.</i> |
| 3 | Ličinka | 572 | 30 | Neidentificirano |
| 4 | Ličinka | 590 | 31 | <i>Oscheius sp.</i> |



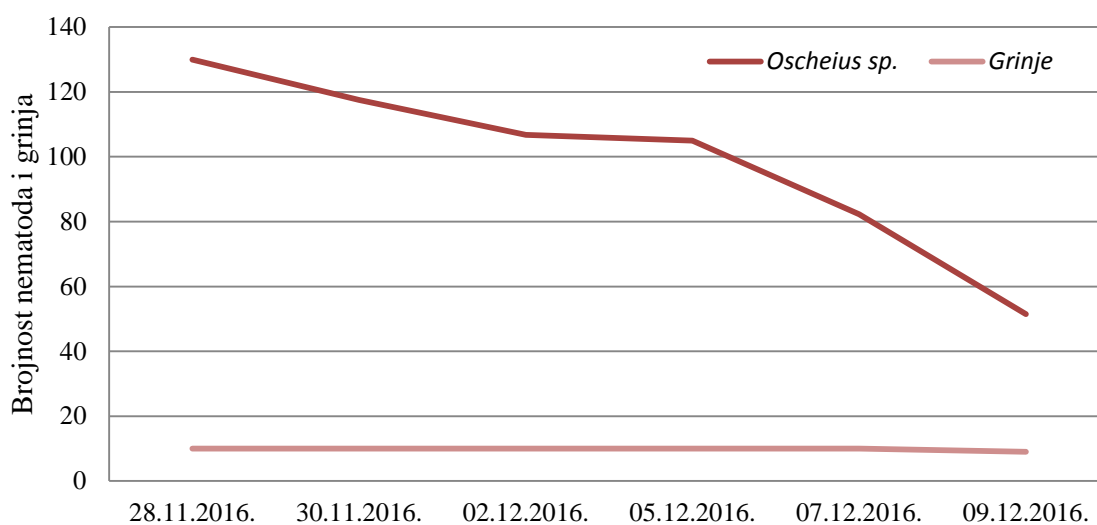
Slika 11. Gusjenice malog voskovog moljca na *White trap* - zaražene s nematodama utvrđenim u pokusu (snimila: Kelemen, B., 2016.)

Nematode iz roda *Oscheius* poznate su kao entomofilne nematode. Smatraju se razlagačima organske tvari, odnosno strvinarima. Biologija i ekologija *Oscheius* vrsta vrlo malo je istražena (Dillman i sur., 2012.). Tek za nekoliko vrsta iz ovog roda je potvrđeno da su patogene za kukce (Sudhaus, 1993.). One sadrže različite rodove simbiotskih bakterija, a najčešće iz roda *Serratia*. Torres-Barragan i sur. (2011.) su utvrdili da su toksini nekih vrsta bakterija iz ovog roda entomopatogeni. Isti autori navode da nematode iz roda *Oscheius* također imaju stadij DL, odnosno kada ličinke trećeg stadija zadrže kutikulu iz drugog stadija razvoja, te im je usni i analni otvor zatvoren. Također, dokazali su da ove nematode mogu penetrirati unutar kukca. Pronašli su toksine simbiotske bakterije iz nematode u hemolimfi uginulog kukca. Za razliku od entomopatogenih nematoda koje nose *Xenorhabdus* ili *Photorhabdus* bakterije u svojim crijevima, entomopatogene bakterije kod *Oscheius* vrsta se često nalaze na površini tijela. Ovo je posebitost entomopatogenih nematoda i još nekih vrsta slobodnoživućih nematoda. U ovom istraživanju, vrsta *O. tipulae* je bila patogena za gusjenice malog voskovog moljca, pa se može zaključiti da nije samo entomofilna nego ju treba svrstati u grupu entomopatogenih nematoda. Slične zaključke objavili su i Dillman i sur. (2012.).

Iz jednog uzorka tla utvrđene su grinje iz skupine Oribatida. Skupina Oribatida sadrži do sada poznatih oko 10 000 vrsta, a pretpostavlja se da veliki broj vrsta nije opisan, te da bi ova skupina mogla sadržavati više od 100 000 vrsta (Schatz, 2002.). Najveći broj vrsta iz ove skupine se smatra razlagačima organske tvari.

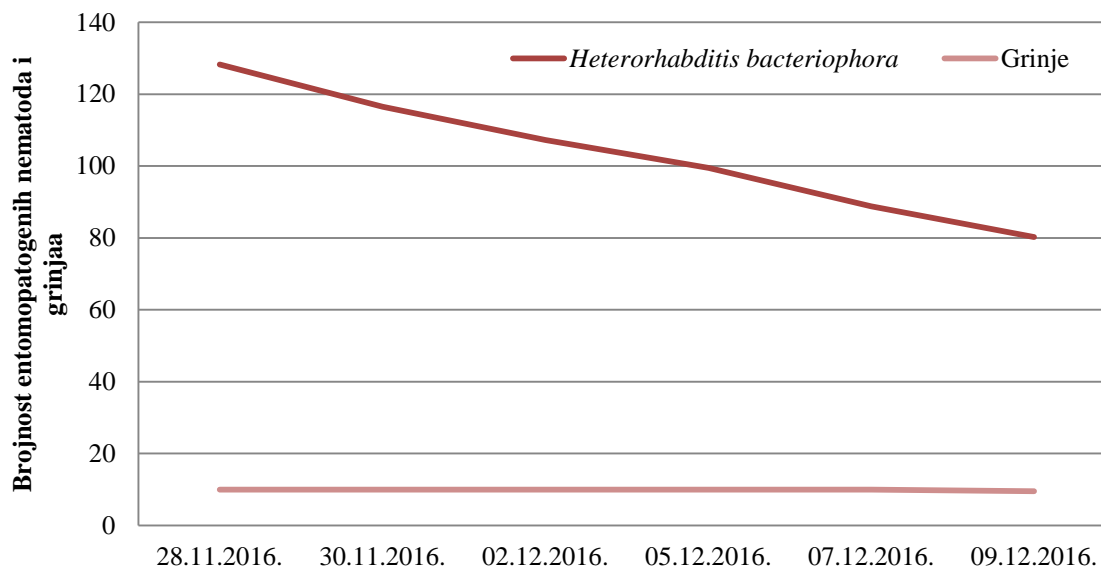
3.3. Interakcija entomopatogenih nematoda i grinja

U grafikonu 1 je prikazana dinamika ishrane grinja s nematodama. U svakom uzorku je bilo 130 nematoda iz roda *Oscheius*, čija se brojnost dva dana nakon postavljanja pokusa nije smanjila. Broj entomopatogenih nematoda se počelo smanjivati četiri dana nakon postavljanja pokusa, a najmanji broj nematoda je utvrđen na kraju pokusa. Broj grinja se nije smanjivao tijekom pokusa, tek zadnji dan je uočena mala razlika u njihovom broju.



Grafikon 1. Dinamika ishrane grinja s nematodama *Oscheius sp.*

U grafikonu 2 je prikazana dinamika ishrane grinja s nematodama *H. bacteriophora*. Dva dana nakon postavljanja pokusa su već uočene razlike u brojnosti entomopatogenih nematoda. Njihova brojnost se postepeno smanjivala tijekom pokusa. Broj grinja se smanjio tek zadnji dan pokusa.



Grafikon 2. Dinamika ishrane grinja s nematodama *H. bacteriophora*

U tablici 4 su prikazani osnovni statistički parametri za entomopatogene nematode. Maksimalan broj ličinki na početku pokusa *H. bacteriophora* i *Oscheius sp.* je bio 130, a nakon pokusa utvrđeno je prosječno 103,41 ličinka *H. bacteriophora* te 98,83 ličinke *Oscheius sp.* Minimalan broj nematoda tijekom pokusa je kod *H. bacteriophora* bio 34 ličinke, odnosno 26 ličinki *Oscheius sp.* Nisu utvrđene statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti vrsta entomopatogenih nematoda.

Tablica 4. Deskriptivni statistički parametri za entomopatogene nematode

| | N | \bar{x} | SD ± | CV | Min | Max |
|-------------------------|----|-----------|-------|-------|-------|--------|
| <i>H. bacteriophora</i> | 24 | 103,41 a | 25,68 | 24,83 | 34,00 | 130,00 |
| <i>Oscheius sp.</i> | 24 | 98,83 a | 38,16 | 38,61 | 26,00 | 130,00 |

Deskriptivni statistički parametri za grinje prikazani su u tablici 5. Brojnost grinja nije se značajno razlikovala između tretmana, odnosno nije zavisila o vrsti entomopatogenih nematoda. Ovi rezultati ukazuju da niti jedna vrsta nematoda nije imala utjecaj na brojnost grinja tijekom 14 dana pokusa.

Tablica 5. Deskriptivni statistički parametri za grinje

| | Tretman | N | \bar{x} | SD \pm | CV | Min | Max |
|--------|-------------------------|----|-----------|----------|------|------|-------|
| Grinje | <i>H. bacteriophora</i> | 24 | 9,91 a | 0,41 | 4,11 | 8,00 | 10,00 |
| | <i>Oscheius sp.</i> | 24 | 9,83 a | 0,56 | 5,74 | 8,00 | 10,00 |

U tablici 6 je vidljivo da nisu utvrđene statistički značajne razlike u brojnosti grinja u oba tretmana uspoređujući datume pregleda. Tek posljednji dan pregleda utvrđeno je manji broj grinja u odnosu na prvi dan pokusa u nekoliko petrijevki, što je u konačnici utjecalo na manju prosječnu brojnost grinja posljednjeg dana pregleda.

Tablica 6. Prosječna brojnost grinja ovisno o periodu interakcije s entomopatogenim nematodama

| Datum pregleda | Grinje | |
|----------------|---------------------|-------------------------|
| | <i>Oscheius sp.</i> | <i>H. bacteriophora</i> |
| 28.11.2016. | 10 a | 10 a |
| 30.11.2016. | 10 a | 10 a |
| 02.12.2016. | 10 a | 10 a |
| 05.12.2016. | 10 a | 10 a |
| 07.12.2016. | 10 a | 10 a |
| 09.12.2016. | 9,00 a | 9,50 a |

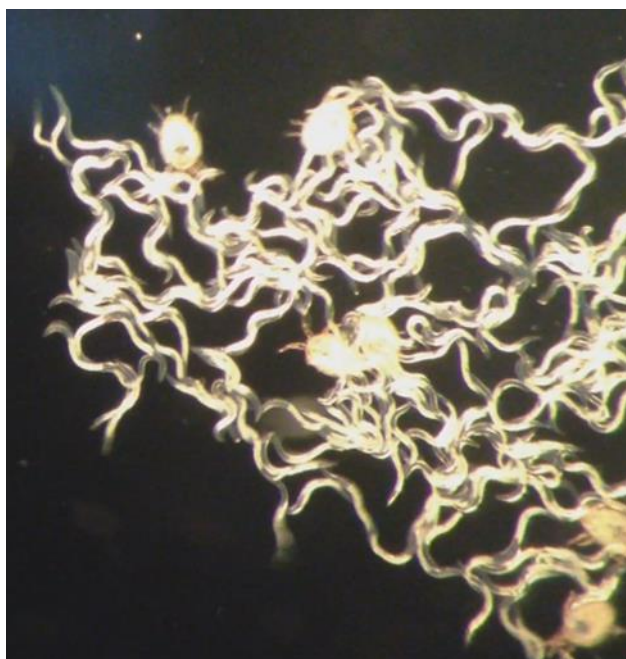
Vrijednosti u stupcu označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($P < 0,05$)

U tablici 7 je prikazana analiza varijance te test značajnosti između srednjih vrijednosti entomopatogenih nematoda. Nije utvrđen statistički značajan utjecaj datuma pregleda na brojnost *H. bacteriophora* izloženih grinjama. Iako se vidi trend pada brojnosti nematoda tijekom inkubacijskog perioda, odnosno da su se grinje hranile s nematodama. Utvrđena je statistički najmanja brojnost *Oscheius sp.* zadnji dan pregleda u odnosu na prvi dan pokusa, kada je utvrđeno prosječno 51,50 ličinki. Također, kao i kod *H. bacteriophora* vidljiv je trend pada brojnosti *Oscheius sp.*, ali su grinje pokazale veći afinitet za ishranu na nematodama iz roda *Oscheius sp.* (Slika 12).

Tablica 7. Prosječna brojnost entomopatogenih nematoda ovisno o periodu izloženosti grinjama

| Datum pregleda | <i>Oscheius sp.</i> | <i>H. bacteriophora</i> |
|----------------|---------------------|-------------------------|
| 28.11.2016. | 130,00 a | 128,25 a |
| 30.11.2016. | 117,50 ab | 116,50 a |
| 02.12.2016. | 106,75 ab | 107,25 a |
| 05.12.2016. | 105,00 ab | 99,50 a |
| 07.12.2016. | 82,25 ab | 88,75 a |
| 09.12.2016. | 51,50 b | 80,25 a |

Vrijednosti u stupcu označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($P < 0,05$)



Slika 12. Grinje i entomopatogene nematode. u pokusu interakcije

(snimila: Majić, I., 2016.)

4. ZAKLJUČAK

Entomopatogene nematode i grinje su mikroskopski organizmi koji se nalaze u svim agroekosustavima i svim tipovima tla. Ti mikroskopski organizmi nam omogućavaju smanjenje korištenja kemijskih sredstava u borbi protiv štetnih zemljišnih kukaca. Intenzivnim korištenjem pesticida i ostalim antropogenim utjecajem je narušena bioraznolikost faune tla.

Od sedam uzoraka koji su uzeti za pokus, iz četiri uzorka smo uspjeli izdvojiti nematode, a iz jednog uzorka grinje. Utvrđene su nematode *Osccheius sp.* i *O. tipulae* te grinje iz skupine Oribatida.

Vidljiv je trend pada brojnosti entomopatogenih nematoda nakon njihove izloženosti grinjama iz skupine Oribatidae. Iz rezultata pokusa se može zaključiti da grinje iz skupine Oribatida pokazuju veći afinitet prema *Osccheius sp.* u odnosu na *H. bacteriophora*, jer se njihova brojnost značajno smanjila tijekom pokusa.

Utvrđena je statistički značajna razlika u brojnosti *Osccheius sp.* zadnjeg dana u odnosu na prvi dan pokusa. Utvrđeno je oko 39% preživjelih ličinki *Osccheius sp.*, dok je oko 62% ličinki *H. bacteriophora* preživjelo nakon izloženosti grinjama iz skupine Oribatida. Rezultati ukazuju da postoji negativna interakcija između entomopatogenih nematoda i grinja iz skupine Oribatida u tlu. Grinje korištene u ovom pokusu su dokazale da su nematofagne.

S obzirom da su se grinje hranile na nematodama, te smanjile njihovu brojnost, u poljoprivrednoj proizvodnji mogu smanjiti učinkovitost primjene entomopatogenih nematoda kao biološke mjere suzbijanja štetnih kukaca. Stoga je važno pratiti populaciju nematofagnih grinju u tlu.

5. POPIS LITERATURE

1. Balogh, J., Balogh, P. (1992.): The oribatid mites genera of the world. Hungarian Natural History Museum, 188.
2. Bažok, R., Gotlin Čuljak, T., Grubišić, D. (2014.): Integrirana zaštita bilja od štetnika na primjerima dobre prakse. Glasilo biljne zaštite, 14(5): 357-390.
3. Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X. (1998.): A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. Nature, 392(6671): 71.
4. Campos-Herrera, R., Půža, V., Jaffuel, G., Blanco-Pérez, R., Čepulytė-Rakauskienė, R., Turlings, T. C. (2015.): Unraveling the intraguild competition between *Oscheius* spp. nematodes and entomopathogenic nematodes: implications for their natural distribution in Swiss agricultural soils. Journal of invertebrate pathology, 132: 216-227.
5. Ciche, T. (2007.): The biology and genome of *Heterorhabditis bacteriophora*. WormBook, 1-9.
6. Darsouei, R., Karimi, J., Shokoohi, E. (2014.): *Oscheius rugaoensis* and *Pristionchus maupasi*, two new records of entomophilic nematodes from Iran. Russian Journal of Nematology, 22(2): 141-155.
7. Dillman, A. R., Chaston, J. M., Adams, B. J., Ciche, T. A., Goodrich-Blair, H., Stock, S. P., Sternberg, P. W. (2012.): An entomopathogenic nematode by any other name. PLoS Pathogens, 8(3): e1002527.
8. Dobrivojević, K., Petanović, R. (1982.): Osnovi akarologije. Slovo ljubve, Institut za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda, Poljoprivredni fakultet, 284.
9. Epsky, N. D., Walter, D. E., Capinera, J. L. (1988.): Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). Journal of Economic Entomology, 81(3): 821-825.
10. Ermilov, S. G., Alvarado-Rodríguez, O., Kontschán, J., Retana-Salazar, A. P. (2014.): The oribatid mite genus *Benoibates* (Acari, Oribatida, Oripodidae). ZooKeys, (442): 51.
11. Gaugler, R. (1988.): Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. Agriculture, ecosystems and environment, 24(1-3): 351-360.

12. Jones, G., Barabas, A., Elliott, W., Parsons, S. (2002.): Female greater wax moths reduce sexual display behavior in relation to the potential risk of predation by echolocating bats. *Behavioral Ecology*, 13(3): 375-380.
13. Kiontke, K., Fitch, D. H. (2005.): The phylogenetic relationships of *Caenorhabditis* and other rhabditids. *WormBook*, 11: 1-11.
14. Koppenhofer, A. M., Campbell, J. F., Kaya, H. K., Gaugler, R. (1998.): Estimation of entomopathogenic nematode population density in soil by correlation between bait insect mortality and nematode penetration. *Fundamental and Applied Nematology*, 21(1): 95-102.
15. Laznik, Ž. Zastopanost entomopatogenih ogorčic (Nematoda: Rhabditida) v Sloveniji in njihove interakcije v okolju. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, 2011.
16. Lewis, E. E., Campbell, J. F., Gaugler, R. (1998.): A conservation approach to using entomopathogenic nematodes in turf and landscapes. *Conservation Biological Control*. Academic Press, New York, NY, 235-254.
17. Majić, I., Raspudić, E., Ivezić, M., Brmež, M., Sarajlić, A., Mirković, A. (2013.): Susceptibility of *Phytodecta fornicata* (Coleoptera: Chrysomelidae) to *Heterorhabditis bacteriophora*. U: Zbornik radova, *Biological Control - its unique role in organic and integrated production*, Johanns, A. J., Bažok, R., Crickmore, N., Lopez-Ferber, M., Glazer, I., Quesada-Moraga, E., Traugott, M. (ur.), Zagreb : IOBC-WPRS Bulletin, 90: 309-312.
18. Muraoka, M., Ishibashi, N. (1976.): Nematode-feeding mites and their feeding behavior. *Applied Entomology and Zoology*, 11(1): 1-7.
19. Mirković, A. Suzbijanje lucernine zlatice (*Phytodecta fornicata* Brugg.) entomopatogenim nematodama *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar. Završni rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 2011.
20. Nježić, B. (2016.): Entopatogene nematode u biološkoj zaštiti bilja. *Glasnik zaštite bilja*, 39(4): 10-14.
21. SAS Institute. (2007.): *SAS/STAT User's guide: statistics*. SAS Institute Cary, NC.
22. Schneider, K., Migge, S., Norton, R. A., Scheu, S., Langel, R., Reineking, A., Maraun, M. (2004.): Trophic niche differentiation in soil microarthropods (Oribatida, Acari): evidence from stable isotope ratios ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). *Soil Biology and Biochemistry*, 36(11): 1769-1774.

23. Strong, D. R., Maron, J. L., Connors, P. G., Whipple, A., Harrison, S., Jefferies, R. L. (1995.): High mortality, fluctuation in numbers, and heavy subterranean insect herbivory in bush lupine, *Lupinus arboreus*. *Oecologia*, 104(1): 85-92.
24. Sudhaus, W. (1993.): Redescription of *Rhabditis (Oscheius) tipulae* (Nematoda: Rhabditidae) associated with leatherjackets, larvae of *Tipula paludosa* (Diptera: Tipulidae). *Nematologica*, 39(1): 234-239.
25. Torres-Barragan, A., Suazo, A., Buhler, W. G., Cardoza, Y. J. (2011.): Studies on the entomopathogenicity and bacterial associates of the nematode *Oscheius carolinensis*. *Biological control*, 59(2): 123-129.
26. Vidaček, Ž., Mihalić, A., Karavidović, P., Galović, V. (1997.): Agroekološke značajke istočne Slavonije i Baranje. *Agronomski glasnik*, 59(5-6): 333-362.
27. Walter, D. E., Kaplan, D. T., Davis, E. L. (1993.): Colonization of greenhouse nematode cultures by nematophagous mites and fungi. *Journal of nematology*, 25(4S): 789.
28. Ye, W., Torres-Barragan, A., Cardoza, Y. J. (2010.): *Oscheius carolinensis* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a potential entomopathogenic nematode from vermicompost. *Nematology*, 12(1): 121-135.
29. Zhang, K. Y., Liu, X. H., Tan, J., Wang, Y., Qiao, L., Yedid, G., Su, Z. Y. (2012.): *Heterorhabditoides rugaoensis* n. sp. (Rhabditida: Rhabditidae), a novel highly pathogenic entomopathogenic nematode member of Rhabditidae. *Journal of nematology*, 44(4): 348.

Internetske stranice:

Benčina, L., Rožac, V., Bolšec, B.: Plan upravljanja Parkom prirode Kopački rit. Datum nastanka dokumenta: lipanj 2011. https://pp-kopacki-rit.hr/docs/plan_upravljanja.pdf (datum pristupa 7.1.2017.)

Udruga CROMETEO – motrenje i prognoziranje vremena: Klima. <http://www.crometeo.hr/klima/> (datum pristupa 8.1.2017.)

European and Mediterranean Plant Protection Organization: List of biological control agents widely used in the EPPO region. http://archives.eppo.int/EPPOStandards/biocontrol_web/bio_list.htm (datum pristupa 18.3.2017.)

