

Kompatibilnost entomopatogenih nematoda i biostimulatora

Forić, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:229404>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-25**



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
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Nikolina Forić, absolvent

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**KOMPATIBILNOST ENTOMOPATOGENIH
NEMATODA I BIOSTIMULATORA**

Diplomski rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Nikolina Forić, apsolvant

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**KOMPATIBILNOST ENTOMOPATOGENIH
NEMATODA I BIOSTIMULATORA**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

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

Osijek, 2018.

SADRŽAJ

KRATICE

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Entomopatogene nematode.....	3
2.1.1. Interakcija EPN sa kukcima i drugim organizmima	4
2.1.2. Strategija traženja domaćina	5
2.1.3. Način infekcije kukca i parazitacija	6
2.1.4. Čimbenici koji utječu na infektivnost i opstanak EPN	7
2.2. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	8
2.3. <i>Steinernema feltiae</i>	9
2.4. Proizvodnja EPN.....	10
2.4.1. Uvjeti i način primjene EPN	11
2.4.2. Mogućnost miješanja EPN sa sredstvima za zaštitu bilja	11
2.5. Agrokemikalije	12
2.5.1. Kemijski pesticidi	12
2.5.2. Biostimulatori	14
3. MATERIJAL I METODE.....	15
3.1. Statistička analiza podataka	17
4. REZULTATI	18
5. RASPRAVA.....	23
6. ZAKLJUČAK.....	26
7. POPIS LITERATURE.....	27
8. SAŽETAK.....	31
9. SUMMARY	32
10. POPIS TABLICA.....	33
11. POPIS SLIKA	34
12. POPIS GRAFIKONA.....	35

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

KRATICE

IPM engl. Integrated Pest Management

hrv. integrirana zaštita bilja

EPN entomopatogene nematode

IJ infektivne ličinke 3. stadija

ISO izolat

B.t.k. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

1. UVOD

Intenziviranje poljoprivredne proizvodnje, povećanje površina pod istom kulturom, razvoj svjetske trgovine poljoprivrednim proizvodima, sjemenskim i sadnim materijalom kao i niz drugih čimbenika doveli su do porasta važnosti poljoprivrednih štetnika. Suvremena poljoprivredna proizvodnja, bez koje je nemoguće osigurati dostatne količine hrane za prehranu cjelokupnoga svjetskog stanovništva, ne može se zamisliti bez uspješnih mjera suzbijanja štetočinja (Bažok, 2014.). S obzirom da štetni organizmi na bilju pričinjavaju ekonomski značajne gubitke u prinosu, prosječno 40% (Majić, 2014.), od druge polovice 20. stoljeća primjena kemijskih sredstava za zaštitu bilja postaje najvažnija mjera zaštite bilja od štetnih organizama (Brokulić i sur., 2015.). Proizvodnja pesticida diljem svijeta porasla je po stopi od oko 11% godišnje s 0,2 milijuna tona 1950-tih, na više od 5 milijuna tona u 2000. godini (Carvalho, 2017.). Brojni toksikološki, ekotoksikološki, ekološki i ekonomski razlozi pokazuju da je primjenu kemijskih mjera zaštite bilja potrebno racionalizirati (Brokulić i sur., 2015.). Osim ekološkoga značaja, intenzivna i prekomjerna uporaba pesticida dovela je do pojave otpornosti kukaca prema najčešće korištenim aktivnim tvarima insekticida. Do sada je kod više od 450 vrsta kukaca i paučnjaka utvrđena pojava otpornosti na jedan ili više pesticida (Majić, 2014.), a jedan od načina da se spriječi ili odgodi nastanak rezistencije je primjena integrirane zaštite bilja (eng. *Integrated Pest Management* (IPM)) (Oerke, 2006.). Ako agrotehničke mjere nisu dovoljne za održavanje štetnika ispod kritičnog broja, pristupa se biološkoj, biotehničkoj, i kao posljednju mogućnost kemijskoj zaštiti (Bažok, 2014.).

Biološka kontrola štetnih kukaca sastoji se od uvođenja patogenih, korisnih grabežljivih ili parazitnih vrsta organizama (Tiago i sur., 2014.), kao što su korisni kukci, nematode, grinje, virusi, bakterije i gljivice. Među organizmima postoji prirodna ravnoteža, ali je najčešće nedovoljna za zadovoljavajuće rezultate pri uzgoju kulturnoga bilja, stoga se pod biološkom zaštitom smatra i manipulacija prirodnih neprijatelja od strane čovjeka (Sarajlić, 2014.). Entomopatogene nematode (EPN) iz porodice Steinernematidae i Heterorhabditidae, te njihove simbiozne bakterije imaju veliki značaj u biološkoj kontroli štetnika. Razumijevanje biologije nematoda, raspon domaćina i epizootije uz napredak u komercijalizaciji proizvodnje i skladištenju rezultiralo je njihovom primjenom u posljednjih 30 godina predstavljajući ih kao sigurnu alternativu

kemijskim insekticidima (Arthus i sur., 2007.). EPN suzbijaju veliki broj ekonomski značajnih štetnika, a njihova veća djelotvornost može se postići genetičkim poboljšanjem samog organizma, metodom primjene, formulacijom, ili kroz manipulaciju okolišem (Shapiro-Ilan i sur., 2017.). Upotreba EPN u kombinaciji s kompatibilnim kemijskim sredstvima zaštite bilja, te drugim agrokemikalijama predstavlja važnu komponentu u IPM sustavima poljoprivredne proizvodnje (Laznik i Trdan, 2017.).

Cilj ovog rada je utvrditi kompatibilnost entomopatogenih nematoda iz roda *Steinernema* i *Heterorhabditis* pri miješanju s različitim koncentracijama biostimulatora Kendal Nem.

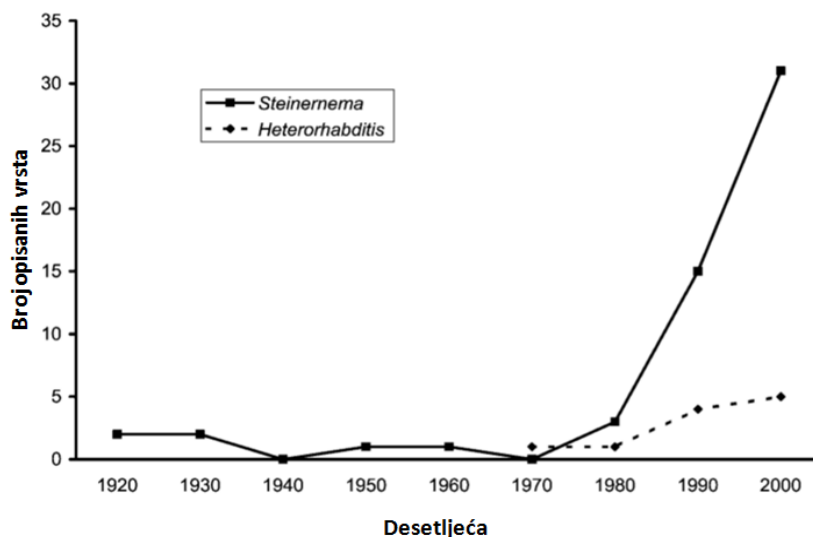
2. PREGLED LITERATURE

2.1. Entomopatogene nematode

Nematode su sveprisutna skupina beskralješnjaka i pronađene su u gotovo svim dostupnim staništima na svakom kontinentu. Koriste razne trofičke strategije i stilove života. Mnoge su vrste povezane s beskralježnjacima, a ti odnosi mogu biti od slučajnih do antagonističkih. Otprilike 25 000 vrsta je opisano, a procjenjuje se da diljem svijeta postoji između 500 000 i 100 000 000 vrsta (Stock i Goodrich-Blair, 2012.).

EPN su prvi puta uočene u 17. stoljeću kada su Aldrovandi (1623.) i Lister (1671.) pronašli crviće u kukcima. Prvi pokušaj biološke kontrole uporabom EPN proveden je 1930. godine kada su ih Glaser i suradnici uzgojili u dovoljnom broju i primijenili u poljskom pokusu pri suzbijanju japanskog pivca. Rezultati parazitacije kretali su se od 0,3 do 81%, no zbog masovne proizvodnje pesticida, EPN su zanemarene do 1960. godine (Oštrec, 2001.).

Tijekom posljednja dva desetljeća, razvoj molekularne metodologije omogućio je otkrivanje novih vrsta, posebice Steinernematidae kojih je do početka devedesetih godina prošlog stoljeća opisano 45 vrsta od ukupnih 55 vrsta. Heterorhabditidae su manje zastupljene, te je od ukupno 11 vrsta, 9 opisano do 1990. godine (graf 1) (Nguyen i Hunt, 2007.).



Graf 1. Broj opisanih vrsta Steinernematidae i Heterorhabditidae od 1920. do 2000. god.

Izvor: Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts

Devet porodica nematoda ima entomopatogen učinak na kukce, od kojih su četiri: Steinernematidae, Heterorhabditidae, Mermithidae i Allantonematidae, pokazale potencijal u programima integrirane i biološke kontrole štetnih kukaca. Mermithidae su paraziti beskralježnjaka, uglavnom kukaca. Nisu uspostavljene kao biološki kontrolni agensi, jer su rezultati terenskih ispitivanja bili neuvjerljivi i ne postoje ekonomske metode za proizvodnju velikih razmjera. Unutar Allantonematidae vrsta, *Deladenus siricidicola* uspješno se koristi u kontroli šumskog štetnika *Sirex noctilio*. Porodice Steinernematidae i Heterorhabditidae najznačajnije su u mikrobiološkoj kontroli kukaca (Popiel i Hominick, 1992.), i njima se učinkovito suzbijaju pipe, zlatice, gusjenice leptira, muhe, mušice, rovci, komarci i drugi štetnici. Ove nematode su simbiotski povezane s bakterijama iz rodova *Xenorhabdus* i *Photorhabdus*, koje imaju važnu ulogu u savladavanju domaćina koji ugiba nakon 24 ili 48 sati od početka parazitacije (Oštrec, 2001.). U Hrvatskoj su prvi puta utvrđene prirodne populacije entomopatogenih nematoda tijekom 2016. godine (Majić i sur., 2018.).

2.1.1. Interakcija EPN sa kukcima i drugim organizmima

Nematode su iznimno velike zajednice u tlu i međusobno djeluju s različitim organizmima kao što su virusi, bakterije, gljivice, protozoe, virnjaci, druge nematode, skokunci, grinje, dugoživci, gujavice, parazitoidi, kralježnjaci i ostali beskralježnjaci. Neki od ovih organizama mogu imati štetne učinke na EPN kao što su npr. nematofagne gljive i grinje. Različite interakcije poput antagonizma, aditivnosti ili sinergije mogu se pojaviti između EPN i drugih entomopatogena ili drugih agensa biološke kontrole (Shapiro-Ilan i sur., 2017.).

Interakcije EPN i kukaca mogu se podijeliti u najmanje četiri kategorije:

- 1) Oblik komensalizma (*engl. phoretic*): pozitivna interakcija u kojoj kukci nematodama služe kao vektori i sklonište (Dillman i sur., 2012.);
- 2) Saprofitski odnos (*engl. necromenic*): nematode ulaze u živog ili uginulog kukca, te se hrane bakterijama i drugim mikroorganizmima koji se razmnožavaju nakon smrti kukca. U ovoj interakciji neke nematode ne dovode do patogeneze dok druge uzrokuju sterilnost, smanjenu plodnost, skraćen životni vijek, smanjenu aktivnost leta, odgođen razvoj, poremećaje u ponašanju, te fiziološke i morfološke promjene kod kukaca (Stock i Goodrich-Blair, 2012.);

- 3) Fakultativni parazitizam: nematoda određeni period životnog ciklusa provodi unutar kukca, ali može preživjeti bez domaćina;
- 4) Obligatni parazitizam: nematoda živi na račun domaćina.

Interakcija EPN i bakterija dijeli se na:

- 1) Trofizam: nematode se hrane bakterijama;
- 2) Parazitizam: patogene bakterije uzrokuju bolesti nematoda;
- 3) Mutualizam: nematode i bakterije su u simbiotskom odnosu (Dillman i sur., 2012.).

Simbioza EPN i bakterija visoko je specijalizirana na način da svaka vrsta nematode je povezana samo s jednom bakterijskom vrstom, iako se bakterijska vrsta može povezati s više od jedne vrste nematoda. Nematode brzo ubijaju domaćina stvarajući pogodno okruženje za svoj razvoj i razmnožavanje, a bakterije proizvodnjom antibiotika potiskuju konkurentne mikroorganizme i pretvaraju tkivo domaćina u hranu nematodama. Bakterije se pomoću nematoda šire u okolišu uz zaštitu od vanjskog utjecaja (Shapiro-Ilan i sur., 2017.).

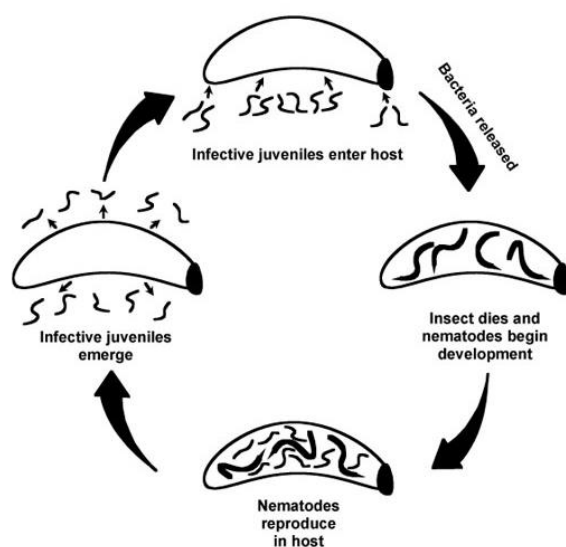
2.1.2. Strategija traženja domaćina

Infektivne ličinke 3. stadija (IJ) nematoda koje parazitiraju kukce prema strategiji traženja domaćina dijele se na pasivne (tzv. „napadače iz zasjede“) i aktivne tragače (Shapiro-Ilan i sur., 2017.). Pasivne vrste EPN koriste strategiju zasjede i obično ostaju na površini ili blizu površine tla i čekaju domaćina. Najčešće su u povijenom položaju, kao da stoje na repu, tako da im je većina tijela u zraku i odskoče, zbog čega su najučinkovitije u suzbijanju vrlo pokretljivih kukaca kao što su gusjenice sovice i skakavci. EPN koje koriste strategiju traženja domaćina vrlo su pokretne i aktivno traže domaćina po cijelom profilu tla. EPN tragači pronalaze svoje domaćine koristeći osjetila i izvore CO₂ ili druge hlapljive tvari koje oslobađaju kukci. Ove nematode su najučinkovitije protiv kukaca koji se sporo kreću i nalaze se na različitim dubinama tla kao što su grčice i pipe (Miles i sur., 2012.). Njihova strategija traženja domaćina utječe na izbor nematode koja će se koristiti u IPM programima. Na sposobnost traženja domaćina utječe i okoliš, no ključna komponenta je osjetilo prema mirisima koje ispuštaju domaćini. Ostali čimbenici koji utječu na EPN u traženju domaćina uključuju fizičke znakove kao što su vibracije, elektromagnetske signale, biljne hlapljive tvari i grupno ponašanje (Shapiro-Ilan i sur., 2017.). Rasmann i

sur. (2005.) su utvrdili da biljni signal u vidu hlapljivih spojeva beta kariofilena koji korijen biljke kukuruza stvara nakon napada kukuruzne zlatice (*Diabrotica virgifera virgifera*) djeluje kao „poziv za pomoć“ privlačeći EPN u zonu korijena kukuruza.

2.1.3. Način infekcije kukca i parazitacija

Infektivne ličinke mogu preživjeti u tlu od nekoliko dana do nekoliko mjeseci. Životni ciklus EPN prikazan je na slici 1. Početak parazitacije kukca započinje aktivnim ulaskom nematoda u domaćina kroz usta, crijevni otvor ili oduške traheja, ali mogu ući i pasivno hranom (Oštrec, 2001.). Nakon kopulacije ženke odlažu jaja u kojima se razvijaju ličinke 1. stadija. Slijede daljnja presvlačenja i razvoj ličinki 2. 3. i 4. stadija, te razvoj mužjaka i ženki druge generacije. Odrasli kopuliraju, a iz odloženih jaja razvijaju se ličinke 1. i 2. stadija. Svi stadiji nematoda hrane se hemolimfom i tkivima kukca. Ličinke kasnog 2. stadija prestaju s ishranom, unose bakterije u svoje probavilo, presvlače se i razvijaju u ličinke 3. stadija koje napuštaju uginulog kukca prelazeći u tlo gdje traže novog domaćina. Trajanje razvojnog ciklusa od ulaska IJ do njihova izlaska iz kukca različito je, i ovisi o vrsti nematode, vrsti kukca, ali i o ekološkim čimbenicima, posebice o temperaturi (Oštrec, 2001.). Tijekom razdoblja razmnožavanja EPN strvine kukaca su izložene riziku konzumacije kukaca strvinara kao što su ose, žohari, cvrčci, skokunci i mravi. Simbiozne bakterije štite EPN na način da produciraju antibiotske spojeve koji odbijaju strvinare (Shapiro-Ilan i sur., 2017.).



Slika 1. Životni ciklus entomopatogenih nematoda

Izvor: Microbial control of insect and mite pests from theory to practice,

Ilustracija: Bill Joyner

2.1.4. Čimbenici koji utječu na infektivnost i opstanak EPN

Nematode su vrlo osjetljive na sušenje jer obitavaju u filmu vode oko čestice tla. Optimalna količina vlage ključna je za opstanak i učinkovitost nematoda, a smrtnost kukaca je niska, čak i odsutna pri iznimno niskim ili visokim razinama vlage. Infektivnost EPN najveća je pri umjerenj vlažnosti tla (-10 do 100 kPa), dok je u mokrim (-1 kPa) i umjerenj suhim (-1000 kPa) tlima infektivnost smanjena (Shapiro-Ilan i sur., 2017.).

Temperatura također utječe na životne funkcije nematoda. Optimalne temperature za reprodukciju Steinernematidae i Heterorhabditidae općenito su između 23 i 28°C, no raspon temperature optimalan za infektivnost ličinki varira između vrsta, pa tako npr. Steinernematidae su više aktivne od Heterorhabditidae na nižim temperaturama, te toleriraju veće temperaturne raspone. Optimalni temperaturni raspon za infekciju je uvijek veći od optimalno temperaturnog raspona za reprodukciju (Popiel i Hominick, 1992.). Dulje izlaganje ekstremnim temperaturama (< 0°C ili > 40°C) je letalno za većinu EPN (Shapiro-Ilan i sur., 2017.).

Nematode poput bakterija, gljivica i biljaka mogu preživjeti nepovoljne okolišne uvjete u stanju mirovanja (dauer stadij). Većina EPN može ući u stanje mirovanja samo izvan domaćina u stadiju infektivne ličinke (Glazer, 2002). EPN u stanju mirovanja ne nastavljaju svoj razvoj dok se ne pojave optimalni okolišni uvjeti, nakon čega se vraćaju u aktivno stanje (Laznik i Trdan, 2017.).

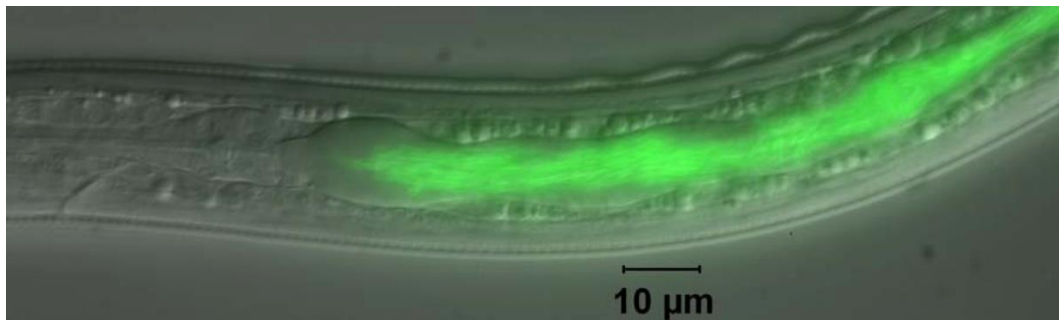
Važan faktor za infektivnost EPN je i tekstura tla. Pjeskovita tla su najpogodnija za kretanja nematoda dok glinena tla usporavanju njihovu mobilnost i infektivnost. Kemijska reakcija (pH) tla u rasponu od 4-8 nema značajan utjecaj na opstanak nematoda, dok pH 10 ili više može biti štetan. Utjecaj parametara tla uključuje teksturu tla, pH i organsku tvar koja može varirati kod različitih vrsta EPN (Shapiro-Ilan i sur., 2017.).

Osim navedenih abiotičkih čimbenika na IJ utječu i njihove energetske rezerve koje im omogućavaju preživljavanje do pojave povoljnog domaćina. S manjkom energije u rezervama opada i infektivnost ličinki (Glazer, 2002.).

2.2. *Heterorhabditis bacteriophora*

Vrsta *H. bacteriophora* pripada razredu Chromadorea, redu Rhabditida, porodici Heterorhabditidae i rodu *Heterorhabditis*. Rod *Heterorhabditis* opisan je 1976. godine, a simbioza između *Heterorhabditis bacteriophora* i bakterije *Photorhabdus luminescens* 1979. godine (Poinar i Grewal, 2012.). U početku su rodove Steinernematidae i Heterorhabditidae smatrali usko povezane unutar reda Rhabditida. To je uglavnom proizlazilo iz činjenice da oba roda dijele mnoga morfološka obilježja i imaju slične životne cikluse koji uključuju vrlo razvijeni, simbiotski odnos sa specifičnim, ali različitim rodovima bakterija (Nguyen i Hunt, 2007.).

Parazitirane ličinke i gusjenice nakon smrti poprimaju crvenu boju i svjetlucaju zbog prisutnosti svjetleće bakterije *P. luminescens* (slika 2.), a nematode se mogu vidjeti kroz kutikulu domaćina (Oštrec, 2001.).



Slika 2. Svjetleća bakterija *Photorhabdus luminescens* u probavi *Heterorhabditis bacteriophora*

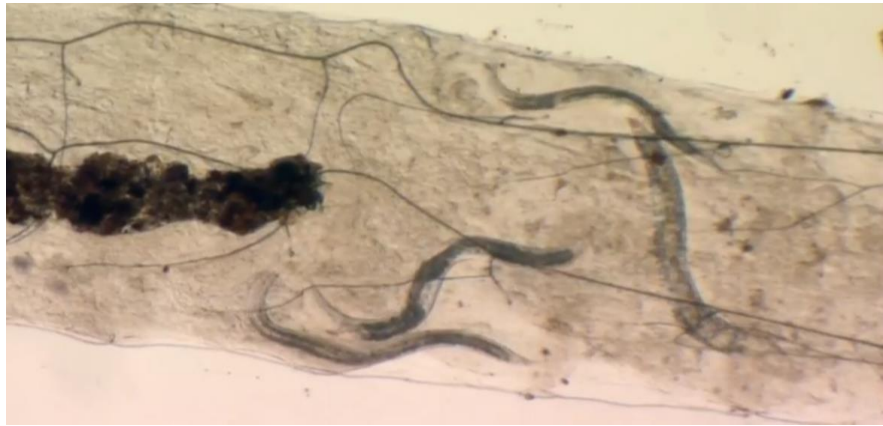
Izvor: www.wormbook.org

Ova entomopatogena vrsta jedinstvena je po prepoznatljivom nekrotiziranom tkivu nalik „zubu“ koji se nalazi na vrhu glave i omogućava IJ ulazak u tjelesnu šupljinu domaćina kroz vanjski tegument, kao i kroz usta, stigme i crijevni otvor (Poinar i Grewal, 2012.). Steinernematidae i Heterorhabditidae imaju sličan razvojni ciklus s razlikom da Heterorhabditidae u prvoj generaciji razvijaju samo hermafrodite, a tek u drugoj generaciji mužjake, ženke i hermafrodite. Vrsta *H. bacteriophora* koristi se u suzbijanju grčica hrušta, ličinki pipa i gusjenica sovice (Oštrec, 2001.).

2.3. *Steinernema feltiae*

Vrsta *S. feltiae* pripada razredu Chromadorea, redu Rhabditida, porodici Steinernematidae i rodu *Steinernema*. Izvorno ju je opisao Filipjev 1934. godine na vrsti gusjenice sovice. *S. feltiae* pripada skupini sličnih vrsta *S. kraussei*, *S. oregonense*, *S. weiseri*, *S. jollieti* i *S. silvaticum*, pa ih se zajedničkim imenom naziva „*feltiae* grupa“. Ova vrsta je najrasprostranjenija unutar porodice Steinernematidae, a njena prirodna staništa su poljoprivredna tla i šume (Nguyen i Hunt, 2007.).

S. feltiae je u simbiotskom odnosu sa bakterijom *Xenorhabdus nematophilus* i koristi se u suzbijanju mušica, pipa, gusjenica leptira, zlatica i drugih štetnika čije ličinke i gusjenice poprimaju žutosmeđu boju nakon smrti (Oštrec 2001.). *S. feltiae* u šampinjonskoj mušici prikazane su na slici 3.



Slika 3. Patogeneza i razmnožavanje *S. feltiae* u ličinci šampinjonske mušice

Izvor: Koppert Biological Systems

2.4. Proizvodnja EPN

Masovna proizvodnja mikrobioloških pesticida pouzdane kvalitete je okosnica industrije biopesticidima. Danas tržištem biopesticida dominiraju korisni kukci, nematode i mikroorganizmi (bakterije, gljivice i virusi). Korisni kukci se razmnožavaju na farmama kukaca i grinja, a mikroorganizmi u laboratorijima na krutim ili tekućim podlogama. EPN iz rodova *Steinernema* i *Heterorhabditis*, mogu se masovno proizvoditi na kukcima domaćinima, ali budući da se hrane bakterijama, a ne kukcima mogu se uzgajati i bez kukaca na umjetnim krutim ili tekućim podlogama (Peters i sur., 2017.).

Nakon masovne proizvodnje EPN mogu se skladištiti u hladene spremnike na ograničeno razdoblje. IJ mogu biti pohranjeni u vodenoj suspenziji na 4 do 15°C (ovisno o vrsti nematode) bez mnogo gubitka u aktivnosti i učinkovitosti. Vrste *Steinernema* skladište se na 6 do 12 mjeseci, a vrste *Heterorhabditis* na 3 do 6 mjeseci. Da bi se poboljšalo rok trajanja i otpornost na ekstremne temperature, razvijene su formulacije koje smanjuju metabolizam imobilizacijom ili se IJ djelomično isuše. Ove formulacije sadrže alginat, vermikulit, glinu, aktivni ugljen, poliakrilamid i vododisperzibilne granule. Teško je dobiti optimalnu formulaciju za sve vrste nematoda jer imaju različite specifične zahtjeve za vlagu i kisik, no jedne od najboljih formulacija su vododisperzibilne granule koje su razvijene za Steinernematidae (npr. *S. carpocapsae* i *S. feltiae*) jer omogućuje relativno dug životni vijek nematode bez hlađenja i s lakoćom rukovanja (Hazir i sur., 2004.).

EPN su sigurne za ljude i druge korisne organizme, a zbog visokog stupnja sigurnosti isključene su iz postupka registracije pesticida u mnogim zemljama kao što su SAD i zemljama članicama EU, osim nekoliko iznimaka kao što su *S. scarabei* i *S. scapterisci*. Danas se proizvode u više od desetak tvrtki diljem svijeta i do sada je najmanje 13 vrsta komercionalno dostupno: *H. bacteriophora*, *H. indica*, *H. marelata*, *H. megidis*, *H. zealandica*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. glaseri*, *S. kushidai*, *S. kraussei*, *S. longicaudum*, *S. riobrave*, i *S. scapterisci* (Shapiro-Ilan i sur., 2017.).

2.4.1. Uvjeti i način primjene EPN

Kao i ostali biološki pesticidi, EPN u laboratoriju su učinkovitije u suzbijanju širokog spektra kukaca zbog kontroliranih uvjeta (Kaya i Gaugler, 1993.). Opće pravilo primjene EPN je aplikacija na tlo u količini od $2,5 \times 10^9$ IJ/ha = 25 IJ/cm², no ako je štetnik osjetljiv na vrstu nematode ili je primjena u kontroliranim uvjetima poput zaštićenih prostora mogu se primjenjivati manje količine (Shapiro-Ilan i sur., 2017.).

Aplikacija se preporuča rano ujutro ili kasno navečer s većim količinama vode kako bi se izbjegla izloženost EPN štetnom UV zračenju koje može negativno utjecati na preživljavanje, infektivnost i reprodukciju. Mogu se primjenjivati u gotovo svim vrstama poljoprivrednih prskalica uz osiguravanje miješanja tekućine za vrijeme primjene kako bi se spriječilo taloženje nematoda. EPN osiguravaju učinkovitu kontrolu štetnika od 2 do 8 tjedna nakon aplikacije što ovisi o nizu čimbenika kao što je tip tla, zemljani pokrov, vrsta i gustoća domaćina, te vrsta nematode (Shapiro-Ilan i sur., 2017.). Ponovna aplikacija EPN je poželjna kako bi se pružila dodatna i dugotrajna kontrola nad štetnikom (Hazir i sur., 2004.). Važno je naglasiti da EPN mogu biti jednako učinkovite kao i kemijski insekticidi kad se primjenjuju pri pogodnim uvjetima (Laznik i sur., 2014.).

2.4.2. Mogućnost miješanja EPN sa sredstvima za zaštitu bilja

EPN se često primjenjuju kod ekosustava na koje se rutinski primjenjuju i druge agrokemikalije poput kemijskih pesticida, gnojiva i biostimulatora (Hazir i sur., 2004.). EPN mogu preživjeti i ako su izložene određenim kemijskim sredstvima, ali vrste interakcija koje se pojavljuju nakon miješanja EPN-a i kemijskih sredstva znatno se razlikuju. Većina provedenih studija koje su ispitivale kompatibilnost EPN-a i kemijskih sredstva provedene su in vitro s izravnim izlaganjem EPN-a kemijskim sredstvima. Postoje znatne razlike u kompatibilnosti EPN-a i kemijskih sredstava iz iste kemijske skupine, zbog čega dolazi do nepouzdanosti podataka. Stoga se svako kemijsko sredstvo treba pojedinačno ispitati kako bi se moglo koristiti u IPM sustavima. Također pojedinačno ispitivanje treba provoditi sa svakom vrstom EPN jer neki kemijski sastojci utječu na smrtnost pojedinih nematoda, dok kod drugih štetni učinci nisu zabilježeni. Kombinirana upotreba EPN i kemijskih sredstava može ponuditi rješenje koje će spriječiti nastanak rezistentnosti štetnika, uz ekonomičnu štednju pri potrebnom broju tretmana za suzbijanje štetnika (Laznik i Trdan, 2017.).

2.5. Agrokemikalije

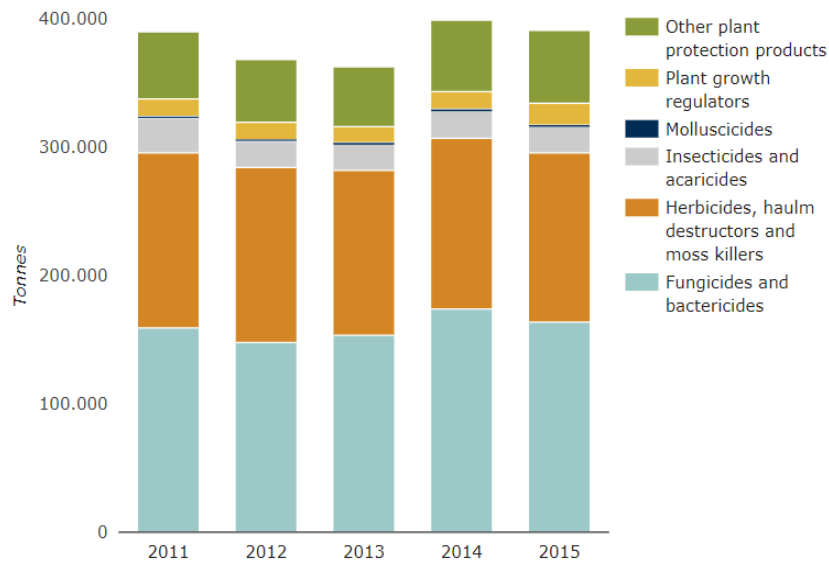
Agrokemikalije su razni kemijski proizvodi koji se koriste u poljoprivredi. Pojam agrokemijsko odnosi se na širok raspon pesticidnih kemikalija, uključujući kemikalije za insekticide, herbicide, fungicide i kemikalije nematocida. U agrokemikalije se svrstavaju i umjetna gnojiva, hormoni, te druga kemijska sredstva za rast biljaka (Speight, 2017.).

2.5.1. Kemijski pesticidi

Uporaba jednostavnih kemijskih spojeva, dostupnih iz okoliša, u svrhu zaštite usjeva i uskladištenih ili prerađenih plodova i namirnica poznata je još iz davnina. Postoje podatci da su Sumerani već 2500 godina pr. Kr. upotrebljavali sumporne spojeve u zaštiti namirnica od kukaca, a prije 3200 godina u drevnoj Kini upotrebljavali su se anorganski spojevi žive i arsena u suzbijanju uši i stjenica. Još i danas se upotrebljava bordoška juha (mješavina modre galice i gašenog vapna) kao sredstvo u suzbijanju plamenjače vinove loze (*Plasmopara viticola*), a prvi puta se spominje 1865. godine. Dvije godine kasnije uvodi se primjena otopine kobaltovog arsenata („pariško zelenilo“) i kerozina u zaštiti bjelogoričnih stabala te se smatra da time počinje razdoblje tzv. znanstveno potkrijepljene uporabe pesticida. Uporaba kemijskih pesticida kulminirala je 40-ih godina 20. stoljeća otkrićem Paula Müllera i novosintetiziranog spoja DDT-a s insekticidnim djelovanjem. Njegova masovna proizvodnja i primjena počinje u Drugom svjetskom ratu. Unutar desetak godina otkriveno je pesticidno djelovanje mnogih sintetskih spojeva poput heksaklorocikloheksana, 2,4-diklorofenoksiocetene kiseline (2,4-D), ditiokarbamatnih spojeva, klordana, organofosfatnih spojeva koji su plasirani na tržište (Želježić i Perković, 2011.).

Unatoč jasnom povećanju uporabe pesticida, gubitci usjeva nisu značajno smanjeni tijekom posljednjih 40 godina (Oerke, 2006). Ukupna prodaja pesticida unutar EU izražena u tonama za razdoblje od 2011. do 2015. godine prikazana je na grafu 2.

Današnja poljoprivreda se suočava s izazovom ispunjenja zahtjeva za hranom koji zadovoljavaju ciljeve održivosti. Postizanje sigurnosti hrane i promicanje sigurnosti hrane na globalnoj je razini, a prilagodba klimi i gubitak bioraznolikosti uz degradaciju ekosustava danas su glavni izazovi s kojima se suočavamo (Lamichhane, 2017).



Graf 2. Ukupna prodaja pesticida u EU izražena u tonama

Izvor: European environment agency, Internet stranica

Od 2014. godine, prema direktivi o „Održivoj upotrebi pesticida“ (NN 14/14) članice EU obavezne su primjenjivati sustave integrirane zaštite bilja koja podrazumijeva minimalnu uporabu pesticida. Svake godine sve je manje sredstava za zaštitu bilja, odnosno djelatnih tvari, registrirano i dozvoljeno za uporabu u državama EU. Nedavna istraživanja ukazuju da će radikalnim smanjivanjem upotrebe pesticida poljoprivredna proizvodnja trpjeti značajne ekonomske gubitke. Ekonomisti upozoravaju da će takva proizvodnja biti visokorizična za sve dionike u poljoprivredi, od poljoprivrednika do ulagača (Majić, 2014.).

Kao što je već navedeno EPN su alat biološke zaštite bilja i mogu se implementirati u IPM sustave poljoprivredne proizvodnje. Njihova kompatibilnost sa mnogim kemijskim sredstvima pospešuje učinkovitost aplikacije uz manji broj potrebnih tretmana i smanjenje toksikoloških, ekotoksikoloških, ekoloških zagađenja uzrokovanih upotrebom kemijskih sredstava.

2.5.2. Biostimulatori

Biostimulatori su sredstva za reguliranje rasta i ublažavanje biološkog stresa kao što su npr. nagle vremenske promjene tijekom ontogeneze. Uključuju mnoge proizvode koji su opisani kao biogeni stimulatori, sredstva za pojačavanje metabolita, sredstva za ukorjenjivanje, regulatore rasta, alelopatske pripravke i biofertilizatore. Biostimulatori su najčešće organskog podrijetla i mogu sadržavati žive ili nežive mikroorganizme i njihove metabolite, različite vrste algi, dijelove biljaka (sjemenke, lišće, korijenje, eksudate), hidrolizirane bjelančevine i aminokiseline životinjskog podrijetla uključujući otpad i nusproizvode, te derivate hitina iz kukaca. Biostimulatori obuhvaćaju i pripravke dobivene iz ekstrakta hranjivih otpadaka ili industrijskih otpadnih tokova, komposta, gnojiva, vermikomposta i ostatka akvakulture. Zbog raznolikosti izvornih materijala i tehnologije ekstrakcije, način djelovanja biostimulatora nije lako utvrditi (Yakhin i sur., 2017.).

Kendal Nem je proizvod talijanske tvrtke Valagro (distributer u Hrvatskoj je Agrochem Max). Pomaže biljkama u nepovoljnim uvjetima, oporavlja tlo pogođeno fitoparazitskim nematodama i povećava otpornost korijena i potiče rast korjenovih dlačica. Sastoji se od ekstrahiranih spojeva različitih vrsta biljaka (www.valagro.com).

3. MATERIJAL I METODE

Metode pokusa rađene su prema istraživanjima kompatibilnosti nematoda s pesticidima prema Laznik i Trdan (2014., 2017.) U laboratoriju za nematologiju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek proveden je pokus u kojem je ispitan učinak biostimulatora Kendal Nem na EPN vrste: *H. bacteriophora* (ISO13) i *S. feltiae* (ISO18). Pokus je postavljen 03.07.2018. god. u Petrijevim zdjelicama pri sobnoj temperaturi (oko 22°C). Pokus je proveden s dvjema koncentracijama Kendal Nem, pri čemu se ispitivao učinak preporučene doze proizvođača (100%) i učinak dvostruke preporučene doze (200%) na aktivnost nematoda (slika 4.). Nematode korištene u pokusu su hrvatski sojevi uzgojeni u laboratoriju za nematologiju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Do postavljanja pokusa, nematode su čuvane u posudama za uzgoj u otopini M9, u hladnjaku na 4°C.



Slika 4. Otopine s nematodama i biostimulatorom Kendal Nem prije mješanja

Izvor: N. Forić

Pokus je proveden po metodi slučajnog blok sustava s dva tretmana i u tri ponavljanja. U prvom pokusu ispitan je ISO13, u drugom pokusu ISO18, a kontrolni tretmani s oba izolata nematoda provedeni su u destiliranoj vodi (slika 5.).

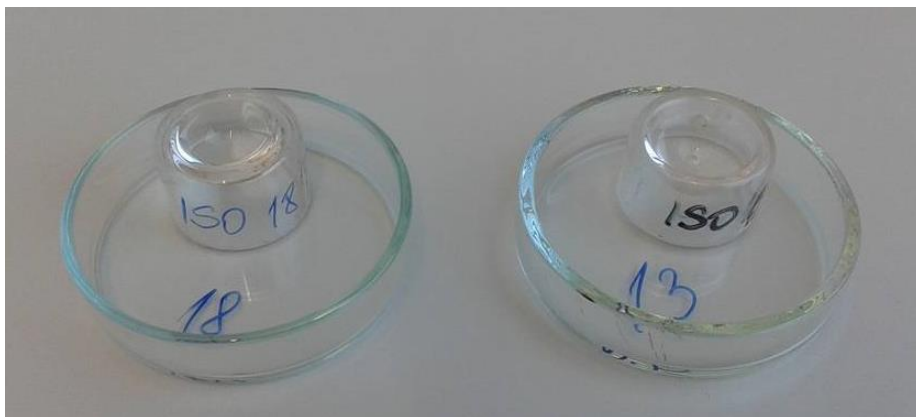
Prosječna brojnost nematoda u 1 mL tekućine je 690, a svaka Petrijeva zdjelica sadržavala je 5 mL otopine. Brojnost živih i infektivnih nematoda utvrđena je izdvajanjem tri kapljice od 50 µl automatskom pipetom iz svih tretmana i ponavljanja, što je ponovljeno tri puta. Vitalnost i mortalitet infektivnih ličinki nematoda je praćena je 1, 3, 24, 48 i 72 sata nakon miješanja nematoda i biostimulatora. Nematode koje se nisu micale nakon dodirivanja pecaljkom smatrale su se uginulima. Tokom pokusa Petrijeve zdjelice odložene su u mračnom prostoru kako bi se stimulirala aktivnost nematoda koje životni ciklus provode u tlu.



Slika 5. Postavljanje pokusa

Izvor: I. Majić

Nakon provedenog pokusa ispitala se patogenost preživjelih ličinki nematoda, koje su ušle u *dauer stadij*. Iz Petrijevih zdjelica izdvojeno je deset ličinki u *dauer stadiju* obje vrste EPN, te su premještene u fiksacijske posudice s destiliranom vodom (slika 6.). Nakon sat vremena u destiliranoj vodi nematode su ponovno premještene u destiliranu vodu kako bi se utjecaj biostimulatora dodatno pročistio u sljedećih 24 h.



Slika 6. Fiksacijske zdjelice s destiliranom vodom i deset IJ entomopatogenih nematoda ISO13 i ISO18

Izvor: N. Forić

U male Petrijeve zdjelice postavljen je navlaženi filter papir i jedna ličinka malog voskovog moljca (*Achroia grisella*) te je dodano deset IJ u *dauer stadiju* (slika 7.), te se patogenost EPN ispitala kroz 72 h. Kontrolni tretman postavljen je s nematodama iz kontrolnog tretmana u destiliranoj vodi.



Slika 7. Ispitivanje patogenosti preživjelih nematoda

Izvor: N. Forić

3.1. Statistička analiza podataka

Prije analize svi podatci kontrolne skupine su korigirani pomoću Abbotove formule (Abbott, 1925.). Podaci su analizirani standardnim statističkim metodama (GLM, ANOVA), a dobivene srednje vrijednosti testirane su sa Tukey's testom na razini signifikantnosti $\alpha = 0,05$ (SAS 9.2).

4. REZULTATI

U tablici 1 prikazani su rezultati GLM analize za izolat 13, pri čemu je vidljiva visoka statistička značajnost koncentracije biostimulatora na mortalitet nematoda nakon 48 h inkubacije. Ista statistička značajnost koncentracija nakon 48 h inkubacije vidljiva je u tablici 2 koja predstavlja mortalitet nematoda za izolat 18.

Tablica 1. GLM analiza mortaliteta entomopatogenih nematoda izolata 13 kroz različiti vremenski period inkubacije u biostimulatoru

	broj sati (h) nakon miješanja nematoda s biostimulatorom				
	1	3	24	48	72
Izolat	n.s	*	*	*	n.s
Konc.	n.s	n.s	**	***	***
Izolat*konc.	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s

*značajnost na razini 95% vjerojatnosti ($P < 0,05$)

**značajnost na razini 99% vjerojatnosti ($P < 0,01$)

***značajnost na razini 99,99% vjerojatnosti ($P < 0,001$)

Tablica 2. GLM analiza mortaliteta entomopatogenih nematoda izolata 18 kroz različiti vremenski period inkubacije u biostimulatoru

	broj sati (h) nakon miješanja nematoda s biostimulatorom				
	1	3	24	48	72
Izolat	n.s	*	*	*	n.s
Konc.	n.s	n.s	**	***	***
Izolat*konc.	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s

*značajnost na razini 95% vjerojatnosti ($P < 0,05$)

**značajnost na razini 99% vjerojatnosti ($P < 0,01$)

***značajnost na razini 99,99% vjerojatnosti ($P < 0,001$)

Tablica 3. Srednje vrijednosti mortaliteta nematoda ukupno za oba izolata ovisno o koncentracijama biostimulatora

Tretman (% konc. biostimulatora)	broj sati (h) nakon miješanja nematoda s biostimulatorom				
	1	3	24	48	72
0	30,57 a	44,96 a	37,67 b	45,18 b	38,28 b
100	26,22 a	51,84 a	58,26 ab	94,92 a	93,49 a
200	20,93 a	39,30 a	80,34 a	100,00 a	100,00 a

Vrijednosti u koloni s različitim slovima označavaju statističku značajnost ($P < 0,05$).

Iz tablice 3 vidljiv je mortalitet srednjih vrijednosti po koncentracijama 0, 100 i 200% statistički ne razlikuje za mjerenja nakon 1 i 3 h inkubacije. Statistički značajno povećanje mortaliteta u odnosu na kontrolu, utvrđeno je u dvostruko preporučenoj dozi biostimulatora (200%) nakon 24 h kada je mortalitet EPN iznosio 80,34%, a u kontrolnom tretmanu 37,67%. Porast mortaliteta utvrđen je i u mjerenju nakon 48 i 72 h inkubacije pri čemu zapažamo visoku statističku razliku između kontrolnog tretmana od 38,28% i preporučene doze biostimulatora (100%) gdje je mortalitet bio veći od 90%, te pri dvostruko preporučenoj dozi biostimulatora (200%) kod koje je stopa mortaliteta u oba zadnja mjerenja iznosila 100%.

Tablica 4. Srednje vrijednosti mortaliteta nematoda izolata 13 i 18 u različitim koncentracijama tretmana

Tretman (% konc. biostimulatora)		broj sati (h) nakon miješanja nematoda s biostimulatorom				
		1	3	24	48	72
ISO 13	0	31,25 a	55,01 a	47,84 a	56,92 b	46,22 b
	100	27,18 a	63,39 a	71,83 a	100,00 a	100,00 a
	200	13,88 a	46,66 a	82,35 a	100,00 a	100,00 a
ISO 18	0	29,89 a	34,91 a	27,51 b	33,45 b	30,34 b
	100	25,26 a	40,30 a	44,70 ab	89,85 a	86,98 a
	200	27,97 a	31,94 a	78,34 a	100,00 a	100,00 a

Vrijednosti u koloni s različitim slovima označavaju statističku značajnost ($P < 0,05$).

U tablici 4 prikazane su srednje vrijednosti tretmana za izolata 13 i 18. Kod izolata 13 nije utvrđena statistički značajna razlika nakon 1, 3 i 24 h inkubacije između kontrolnog tretmana u destiliranoj vodi i koncentracija biostimulatora od 100 i 200%. Pri mjerenju mortaliteta nakon 48 i 72 h zapaženo je visoko povećanje mortaliteta u tretmanima s koncentracijama biostimulatora od 100 i 200% u odnosu na kontrolni tretman što je statistički značajno, te je zabilježen mortalitet izolata 13 od 100%.

Slični rezultati dobiveni su i kod izolata 18 gdje nije zabilježena statistički značajna razlika između tretmana nakon 1 i 3 h inkubacije. Mjerenje mortaliteta nakon 24 h prikazuje statistički značajnu razliku između kontrolnog tretmana (27,51%) i dvostruke preporučene doze biostimulatora (200%) pri čemu je zabilježen mortalitet od 78,34%. Statistički značajna razlika nije zabilježena između kontrolnog tretmana i preporučene doze biostimulatora (100%) nakon 24 h inkubacije. Kao i kod izolata 13 nakon 48 i 72 h inkubacije uočen je statistički značajan porast mortaliteta u usporedbi sa kontrolnim tretmanom.

Tablica 5. Srednje vrijednosti mortaliteta izolata 13 i 18 u kontrolnom tretmanu kroz različiti vremenski period

Izolat	broj sati (h) nakon miješanja nematoda s biostimulatorom				
	1	3	24	48	72
ISO13	31,25 a	55,02 a	47,84 a	56,92 a	46,22 a
ISO18	29,89 a	34,92 a	27,51 a	33,45 b	30,35 a

Vrijednosti u koloni s različitim slovima označavaju statističku značajnost ($P < 0,05$).

U tablici 5 prikazane su srednje vrijednosti mortaliteta izolata 13 i 18 u kontrolnom tretmanu (konc. 0%) iz čega vidimo da nije utvrđena statistički značajna razlika između izolata nakon 1, 3, 24 i 72 h. Statistički značajna razlika između izolata utvrđena je samo nakon 48 h pri čemu je mortalitet ISO 13 iznosio 56,92%, a mortalitet ISO 18 33,45%.

Tablica 6. Srednje vrijednosti mortaliteta izolata 13 i 18 u koncentraciji biostimulatora 100% kroz različiti vremenski period

Izolat	broj sati (h) nakon miješanja nematoda s biostimulatorom				
	1	3	24	48	72
ISO13	27,18 a	63,39 a	71,83 a	100,00 a	100,00 a
ISO18	25,26 a	40,30 a	44,70 a	89,85 a	86,98 a

Vrijednosti u koloni s različitim slovima označavaju statističku značajnost ($P < 0,05$).

Srednje vrijednosti mortaliteta izolata 13 i 18 u preporučenoj koncentraciji biostimulatora (100%) prikazane su u tablici 6, te zapažamo da nije utvrđena statistički značajna razlika između mortaliteta izolata 13 i 18 kroz cijeli period inkubacije od 72 h s obzirom na koncentraciju biostimulatora od 100%.

Tablica 7. Srednje vrijednosti mortaliteta izolata 13 i 18 u koncentraciji biostimulatora od 200% kroz različiti vremenski period

Izolat	broj sati (h) nakon miješanja nematoda s biostimulatorom				
	1	3	24	48	72
ISO13	27,97 a	46,67 a	82,35 a	100,00 a	100,00 a
ISO18	13,88 a	31,94 a	78,34 a	100,00 a	100,00 a

Vrijednosti u koloni s različitim slovima označavaju statističku značajnost ($P < 0,05$).

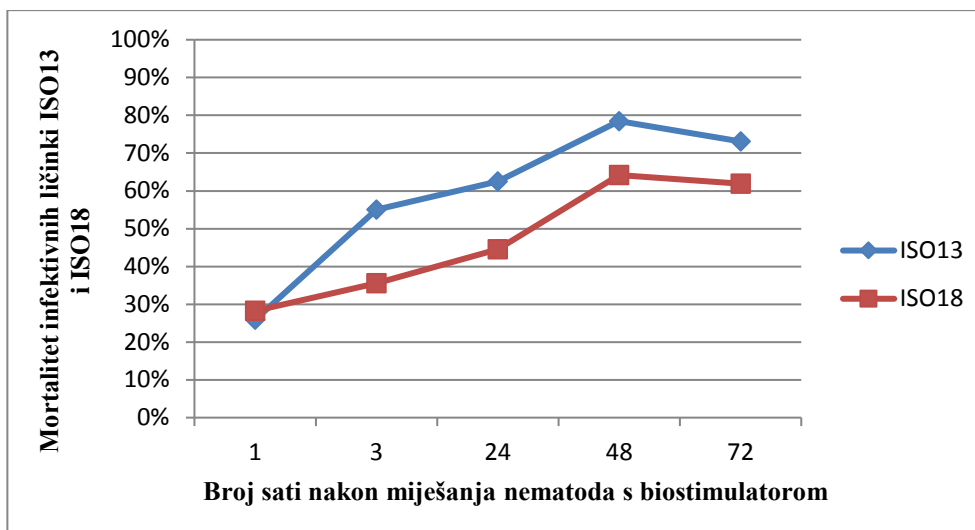
Slični rezultati dobiveni su i pri dvostruko preporučenoj koncentraciji biostimulatora (200%) što prikazuje tablica 7. Nije utvrđena statistički značajna razlika u mortalitetu izolata 13 i 18 kroz cijeli period inkubacije.

Tablica 8. Srednje vrijednosti mortaliteta izolata 13 i 18 neovisno o koncentraciji

Izolat	broj sati (h) nakon miješanja nematoda s biostimulatorom				
	1	3	24	48	72
ISO13	25,89 a	55,02 a	62,46 a	78,46 a	73,11 a
ISO18	28,25 a	35,52 b	44,51 b	64,19 b	61,91 a

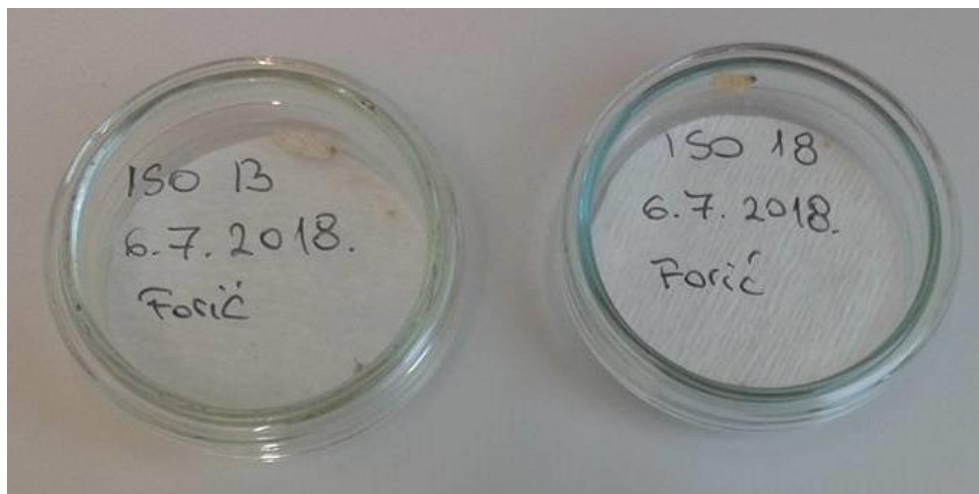
Vrijednosti u koloni s različitim slovima označavaju statističku značajnost ($P < 0,05$).

Tablica 8. prikazuje srednje vrijednosti mortaliteta promatranih izolata neovisno o koncentraciji kroz vremenski period od 72 h. Nakon 1 h inkubacije nije utvrđena statistički značajna razlika mortaliteta izolata, no u mjerenju nakon 3, 24 i 48 h uočavamo statistički značajnu razliku između izolata i zapažamo da ISO 18 ima manju stopu mortaliteta od ISO 13. U zadnjem praćenju mortaliteta nakon 72 h nije utvrđena statistički značajna razlika između izolata, a navedenu dinamiku prikazuje graf 3.



Graf 3. Dinamika stope mortaliteta izolata 13 i 18 pri miješanju s biostimulatorom

Patogenost nematoda ispitana je pomoću metode pročišćivanja u destiliranoj vodi, no sposobnost ponovne aktivnosti tj. vitalnost nije uočena nakon 1h, kao ni nakon 24h u destiliranoj vodi. Aktivnost malog voskovog moljca tokom 72 h nije aktivirala IJ, te njihova patogenost nije utvrđena. Gusjenice su preživjele i započele fazu kukuljenja (slika 8.).



Slika 8. Patogenost IJ nakon 72h nije uočena, gusjenice malog voskovog moljca su započele fazu kukuljenja

Izvor: N. Forić

5. RASPRAVA

Istraživanja u kojima se ocjenjuje kompatibilnost bioloških ili kemijskih sredstava za zaštitu bilja ili drugih agrokemikalija s EPN pokazuju da je kompatibilnost specifična za vrstu, ali nekada i za soj nematoda. Zbog velike varijabilnosti u kompatibilnosti EPN i ispitivanih sredstava svaki se proizvod treba ispitati pojedinačno (Laznik i Trdan 2014.; 2017.). U ovom radu također je uočena varijabilnost između *H. bacteriophora* (ISO 13) i *S. feltiae* (ISO 18). Varijabilnost je bila najviše izražena nakon 3, 24 i 48 h pri čemu je *S. feltiae* pokazala manju osjetljivost prema biostimulatoru, no nakon završetka inkubacije od 72 h kompatibilnost nije potvrđena zbog visoke stope mortaliteta za obje vrste nematoda.

Osim osjetljivosti nematode na ispitivano sredstvo važno je primijeniti odgovarajuću dozu kako bi se postigla kompatibilnost i izbjegao slabiji učinak u suzbijanju štetnika. Važnost odgovarajuće doze u kombiniranim tretmanima s EPN i bakterije ispitali su Zampara i sur. (2014.). Ispitali su mogućnost miješanja s EPN vrste *H. bacteriophora* s drugim bioagentom entomopatogenom bakterijom *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* (B.t.k.) radi suzbijanja ličinki brašnenog moljca (*Ephestia kuehniella*). U istraživanju ispitana je djelotvornost svakog patogena zasebno, pri čemu su dobiveni pozitivni rezultati; smrtnost uzrokovana sporama B.t.k. pri koncentraciji od 500ppm bila je 17%, na 1500ppm 20%, i na 3000ppm 44%. Smrtnost uzrokovana *H. bacteriophora* (1000 IJ/ml) nakon 28 dana bila je 27%, dok je kontrolna smrtnost iznosila 7%. Kombinirani tretmani B.t.k i *H. bacteriophora* provodili su se s tri koncentracije B.t.k. kao i pojedinačni tretmani. Uočeno je sinergično djelovanje samo pri najnižoj koncentraciji B.t.k. od 500ppm pri čemu se smrtnost brašnenog moljca kretala do 93%. Veće koncentracije od 1500ppm i 3000ppm B.t.k. uzrokovale su kompeticiju između dva patogena pri čemu se smrtnost kretala od 27 do 44%, odnosno izostalo je djelovanje EPN. Različit utjecaj koncentracija na EPN u ovom radu očituje se kroz veću stopu mortaliteta pri dvostruko preporučenoj dozi biostimulatora (200%) gdje je zabilježena smrtnost od 100% do kraja inkubacijskog perioda. Kod preporučene doze biostimulatora (100%) uočena je manja stopa mortaliteta koja se kretala do 93,49% no nije utjecala na rezultat istraživanja jer nije statistički značajna s obzirom na koncentraciju od 200%.

Kompatibilnost entomopatogene gljive *Metarhizium anisopliae* i entomopatogenih vrsta nematoda *S. feltiae* i *H. bacteriophora* ispitali su Ansari i sur. (2008.) pri suzbijanju vinove pipe (*Otiiorhynchus sulcatus*). Sinergija između organizama potvrđena je pri istodobnoj primjeni, no mortalitet vinove pipe od 100% zabilježen je kod primjene *M. anisopliae* i izlaganju kukca ovom patogenu tokom dva tjedna, nakon čega su naknadno primijenjene EPN. Osnovni mehanizam ovakve interakcije ostaje nejasan, no Ansari i sur. predložili su mogućnost da je izloženost kukaca gljivi *M. anisopliae* oslabila njihov organizam, te su postali osjetljivi na EPN. Istraživanjem je utvrđeno da je kasnija primjena EPN negativno utjecala na njihovu reproduktivnost jer *M. anisopliae* tijekom patogeneze izlučuje niz enzima i sekundarnih metabolita koji mijenjaju uvjete unutar domaćina i stvaraju nepovoljno okruženje za razvoj EPN. Iste rezultate dobili su Acevedo i sur. (2007.) pri suzbijanju štetnika šećerne trske (*Diatraea saccharalis*) sa gljivom *M. anisopliae* i EPN vrste *H. bacteriophora*.

Majić i sur. (2016.) su utvrdili visoku toksičnost bionematocida, biostimulatora i gnojiva *Nemakey* na vrstu *H. bacteriophora* što je slično s rezultatima ovog istraživanja. Dok su isti autori utvrdili suprotne rezultate testirajući drugi biostimulator *Fermented plant extracts*, a koji je također biljnog porijekla, ali sadržava korisne bakterije i djelovao je stimulatивно na nematode.

Osim odgovarajuće koncentracije, kompatibilnosti EPN i pravovremene primjene potrebno je ispitati djelotvornost svih pomoćnih sredstava koje se koriste u kombinaciji s sredstvima zaštite bilja zbog mogućih negativnih utjecaja na populaciju EPN. Krishnayya i Grewal (2010.) istražili su kompatibilnost između *S. feltiae* i ulja nima (*Azadirachta indica*) koje se široko koristi kao repelent, regulator rasta, te ima želučano i ovicidno djelovanje. Istraživanje je pokazalo da nim čisto ulje nema utjecaj na smrtnost *S. feltiae*, čak ni nakon maksimalnog perioda inkubacije od 120 h, no kombinacija nima s antibakterijskim tekućim sapunom (Ajax) koji se koristi kao sufraktant izazvala je 23-25% mortaliteta *S. feltiae*. Preživjele IJ nisu imale smanjenu virulentnost, a slične rezultate s negativnim utjecajem sufraktanta (M. Pede) dobili su Kaya i sur. (1995.), pri kombinaciji *H. bacteriophora* i *S. carpocapsae* sa sufraktantom. Ovi rezultati sugeriraju upotrebu ispitanog sufraktanta kako ne bi došlo do smanjenja populacije EPN i slabijeg učinka u suzbijanju štetnika.

Utjecaj pesticida i agrokemikalija na ponašanje IJ entomopatogenih nematoda je teško procijeniti zbog njihove sposobnosti da uđu u *dauer stadij* koji im omogućava preživljavanje u mirovanju, i ponovnu aktivnost kada se nađu u povoljnim uvjetima (Laznik i Trdan, 2014.). Zbog specifičnosti *dauer stadija* nakon inkubacijskog perioda s biostimulatorom u trajanju od 72 h ispitana je sposobnost ponovne aktivnosti IJ, no ona nije utvrđena jer su gusjenice malog voskovog moljca preživjele i započele fazu kukuljenja.

6. ZAKLJUČAK

Oba ispitana tretmana pokazala su negativan utjecaj na brojnost i vitalnost *S. feltiae* i *H. bacteriophora*. Usporedbom kontrolnog tretmana izolata 13 i preporučene koncentracije biostimulatora Kendal Nem utvrđeno je postupno povećanje mortaliteta kroz vremenski period koji se kretao od 27,18% (nakon 1 h izloženosti biostimulatoru) do 100,00% (nakon 72 h izloženosti biostimulatoru). Negativni rezultati dobiveni su i s izolatom 18 čiji se mortalitet kretao od 25,26% (nakon 1 h izloženosti biostimulatoru) do 86,98% (nakon 72 h izloženosti biostimulatoru). Prema očekivanom dvostruka preporučena doza također je pokazala negativni utjecaj na brojnost i vitalnost nematoda. Mortalitet izolata 13 nakon 1 h izloženosti biostimulatoru bio je 13,88%, a do maksimalnog inkubacijskog perioda od 72 h ustanovljen je mortalitet od 100%. Mortalitet koji je utvrđen kod izolata 18 kretao se od 27,97% (nakon 1 h izloženosti biostimulatoru) do 100% (nakon 72 h izloženosti biostimulatoru).

Ovaj rad potvrdio je prethodna istraživanja (Laznik i Trdan, 2014.; 2017.) da je kompatibilnost EPN specifična za vrstu, a nekada i soj nematode, što ukazuje na nužnost pojedinačnih ispitivanja agrokemikalija i vrste EPN. Varijabilnost između izolata 13 i 18 kretala se od 25,89% (nakon 1 h izloženosti biostimulatoru) do 73,11% (nakon 72 h izloženosti biostimulatoru) za izolat 13 i od 28,25% (nakon 1 h izloženosti biostimulatoru) do 61,91% (nakon 72 h izloženosti biostimulatoru) za izolat 18. Ovi rezultati pokazuju nešto manju smrtnost izolata 18, iz čega proizlazi da je njena osjetljivost prema biostimulatoru Kendal Nem manja nego za izolat 13, međutim razlika nije statistički značajna, no ukazuje na različitost između organizama.

Rezultati pokazuju izrazito negativan utjecaj biostimulatora Kendal Nem na ispitivane vrste EPN iz čega zaključujemo da neki ili svi sastojci ovog proizvoda nisu kompatibilni s *S. feltiae* i *H. bacteriophora*. Njihovo miješanje nije preporučljivo zbog visoke stope mortaliteta EPN.

7. POPIS LITERATURE

Abbott, W.S. (1925.): A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of economic entomology*, 18:265-267.

Acevedo, J. P. M., Samuels, R. I., Riberio Machado, I., Dolinski, C. (2007.): Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Jurnal of invertebrate pathology*, 96(2): 187-192.

Ansari., M. A., Shah F. A., Butt,T. M. (2008.): Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, control. *Entomologia experimentalis et applicata*, 129(3): 235-359.

Arthus, S., Heinz., Prasifka, J. R. (2007.): An analysis of using entomopathogenic nematodes against above-ground pests. *Bulletin of entomological research*, 94(8): 297-306.

Bažok, R. (2014.): Sigurnost hrane. Ur: Havranek., J. i Tudor Kalit., M. Kemijski kontaminanti: sredstva za zaštitu bilja. Zagreb, M.E.P. d.o.o., 121-137.

Brokulić, A., Budinščak, Ž., Čelig, D., Deždek, B., Hamel, D., Ivić, D., Novak, M., Mrnjavčić Vojvoda, A., Nikl, N., Novak, N., Novaković, V., Pavunić Miljanović, Z., Peček, G., Poje, I., Prpić, I., Herak, T., Ševar, M., Šimala, M. i Turk, R. (2015.): Priručnik za sigurno rukovanje i primjenu sredstava za zaštitu bilja. Zagreb, Ministarstvo poljoprivrede RH, 77.

Carvalho, F. P. (2017.): Pesticides, environment, and food safety. *Food and energy security*, 6(2): 48-60.

Dillman, A. R., Chaston, J. M., Adams, B. J., Ciche, T. A., Goodrich-Blair, H., Stock, P. S., and Sternberg, P. W. (2012.): An entomopathogenic nematode by any other name. *Plos pathogens*, 8(3): e1002527.

Glazer, I. (2002.): Entomopathogenic nematology. Ed: Gaugler, R. *Survival biology*. United Kingdom, Cabi publishing, 169-188.

Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P., Keskin, N. (2004.): Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. Turkish journal of Biology, 27(4): 181-202.

Kaya, H., Gaugler, R. (1993.): Entomopathogenic nematodes. Annual reviews of entomology, 38:181-206.

Kaya, H.K., Burlando, T.M., Choo, H.Y, Thurston, G.S. (1995): Integration of entomopathogenic nematodes with *Bacillus thuringiensis* or pesticidal soap for control of insect pests. Biological control 5, 432- 441.

Krishnayya P. V., Grewal P. S. (2010.): Effect of neem and selected fungicides on viability and virulence of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. Biocontrol science and technology, 12(2): 259-266.

Lamichhane, J. R. (2017.): Pesticide use and risk reduction in European farming systems with IPM: an introduction to the special issue. Crop protection, 97: 1-6.

Laznik, Ž., Trdan, S. (2017.): Biocontrol agents entomopathogenic and slug parasitic nematodes. Ed: Abd-Elgawad, M. M. M., Askary, T. H., Coupland, J. Compatibility between entomopathogenic nematodes and phytopharmaceuticals. United Kingdom, Cabi publishing, 581-595.

Laznik, Ž., Trdan, S. (2014.): The influence of insecticides on the viability of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) under laboratory conditions. Pest management science, 70(5): 784-789.

Majić, I. (2014.): Insekticidi u zaštiti bilja. Ur: Raspudić, E. Biotehnološka rješenja u zaštiti bilja od štetnih kukaca. Osijek, Grafika d.o.o., 46-50.

Majić, Ivana, Sarajlić, Ankica, Tamás Lakatos, Tímea Tóth, Emilija Raspudić, Gabriella Kanižai Šarić, Žiga Laznik (2016.): Compatibility of bio-nematicide and plant stimulant of microbial origin with Heterorhabditis bacteriophora. IOBC/WPRS bulletin, 129, 125-129.

Majić I., Sarajlić A., Lakatos T., Tóth T., Raspudić E., Zebec V., Kanižai Šarić G., Kovačić M., Laznik Ž. (2018.): First report of entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) from Croatia. Helminthologia, 55(3): 256-260.

Miles, C., Blethen, C., Gaugler, R., Shapiro-Ilan, D., & Murray, T. (2012): Using entomopathogenic nematodes for crop insect pest control. *Pacific NW ext publs*, 1-9.

Nguyen, K. B., Hunt, D. J. (2007.): Entomopathogenic nematodes: systematics phylogeny and bacterial symbionts. Ed: Hunt, D. J., Perry R. N. The first entomopathogenic nematodes. The family Steinernematidae. Boston, Brill, 8, 27-34.

Oerke, E. C. (2006): Crop losses to pests. *The journal of agricultural science*, 144(1), 31-43.

Oštrec, Lj. (2001.): Biološko suzbijanje štetnih insekata entomopatogenim nematodama. *Agriculturae conspectus scientificus*, 66(3): 179-185.

Peters, A., Han, R., Yan, X., Leite, L. G. (2017.): Production of entomopathogenic nematodes. Ed: Lacey, L. A. *Microbial control of insect and mite pests, from theory to practice*. Academic press, 157-170.

Poinar, G. O., Grewal, P. S. (2012.): History of entomopathogenic nematology. *The journal of nematologi*, 44(2): 153-161.

Popiel, I., and Hominick, W. M. (1992.): Nematodes as biological control agents: part II. *Advances in parasitology*, 31: 381-433.

Rasmann, S., Köllner, T.G., Degenhardt, J., Hiltbold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Gershenzon, J., Turlings, T.C.J., (2005.): Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 434(7034): 732–737.

Sarajlić, A. (2014.): Insekticidi u zaštiti bilja. Ur: Raspudić, E. *Biološko suzbijanje štetnih kukaca*. Osijek, Grafika d.o.o., 36-45.

Shapiro-Ilan, D., Hazir, S., Glazer, I. (2017.): *Microbial control of insect and mite pests, from theory to practice*. Ed: Lacey, L. A. Basic and applied research: entomopathogenic nematodes. Academic press, United Kingdom, 91-105.

Speight, J. D. (2017.): *Environmental organic chemistry for engineers*. Elsevier, United Kingdom, 161.

Stock, S. P. and Goodrich-Blair, H. (2012.): Manual of techniques in invertebrate pathology. Ed: Lacey, L. A. Nematode parasites, pathogens and associates of insects and invertebrates of economic importance. Elsevier, United Kingdom, 373-426.

Tiago, P. V., Tinti de Oliveira, N., Áurea de Luna Alves Lima, E. (2014.): Controle biológico de insetos utilizando *Metarhizium anisopliae*: aspectos morfológicos, moleculares e ecológicos. *Ciência Rural*, 44(4): 645-651.

Yakhin, O. I., Lubyaynov, A. A., Yakhin, I. A., Brown, P. (2017.): Biostimulants in plant science: A global perspective. *Frontiers in plant science*, 7: 2049.

Zampara I., Zamparas C., Mantzoukas S., Karanastasi E. (2014): Study on the combined action of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Entomologia Hellenica*, 23(2): 74-86.

Željžić, D., Perković, P. (2011.): Uporaba pesticida i postojeće pravne odredbe za njezinu regulaciju. *Sigurnost*, 53(2): 141-150.

Internetske stranice:

Zakon o održivoj upotrebi pesticida. Ustav Republike Hrvatske, Narodne novine, br. 14/2014.

https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2014_02_14_269.html, pristupljeno 14.08.2018.

8. SAŽETAK

Suvremena poljoprivredna proizvodnja zahtjeva poticanje razvoja ekološki prihvatljivih metoda u suzbijanju štetočinja što ukazuje na nužnost uvođenja patogenih, korisnih grabežljivih ili parazitskih organizama u postojeće integrirane sustave zaštite biljaka. Entomopatogene nematode su se pokazale kao značajna biološka komponenta kojom se suzbija veliki broj ekonomski značajnih štetnih kukaca. Njihova djelotvornost može se povećati miješanjem s kompatibilnim kemijskim ili biološkim sredstvima za zaštitu bilja. U ovom radu ispitan je utjecaj biostimulatora Kendal Nem na dvije vrste entomopatogenih nematoda: *Steinernema feltiae* i *Heterorhabditis bacteriophora*. Kompatibilnost nije potvrđena zbog toga što ispitivani biostimulator izaziva visoku stopu mortaliteta obje vrste nematoda.

Ključne riječi: entomopatogene nematode, biološka kontrola, biostimulator, kompatibilnost

9. SUMMARY

Modern agricultural production comprises constant development and application of ecologically sound methods in control of insect pests by introduction of pathogenic, beneficial predatory and/or parasitic organisms in IPM programs. Entomopathogenic nematodes are proven lethal parasites of many important agricultural pests. their efficacy ld be improved by mixing with other compatible agrochemicals and/or biocontrol agents. In this study, we tested compatibility of mixing two entomopathogenic species *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* with biostimulator Kendal Nem. Both species of entomopathogenic nematodes are not compatible with tested biostimulators, since high mortality rate was observed already after 24h of incubation.

Key words: entomopatogenic nematodes, biological control, biostimulants, compatibility

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. GLM analiza mortaliteta entomopatogenih nematoda izolata 13 kroz različiti vremenski period inkubacije u biostimulatoru, str. 18

Tablica 2. GLM analiza mortaliteta entomopatogenih nematoda izolata 18 kroz različiti vremenski period inkubacije u biostimulatoru, str. 18

Tablica 3. Srednje vrijednosti mortaliteta nematoda ukupno za oba izolata ovisno o koncentracijama biostimulatora, str. 19

Tablica 4. Srednje vrijednosti mortaliteta nematoda izolata 13 i 18 u različitim koncentracijama tretmana, str. 19

Tablica 5. Srednje vrijednosti mortaliteta izolata 13 i 18 u kontrolnom tretmanu kroz različiti vremenski period, str. 20

Tablica 6. Srednje vrijednosti mortaliteta izolata 13 i 18 u koncentraciji biostimulatora 100% kroz različiti vremenski period, str. 20

Tablica 7. Srednje vrijednosti mortaliteta izolata 13 i 18 u koncentraciji biostimulatora od 200% kroz različiti vremenski period, str. 21

Tablica 8. Srednje vrijednosti mortaliteta izolata 13 i 18 neovisno o koncentraciji, str. 21

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Životni ciklus entomopatogenih nematoda, str. 6

Slika 2. Svjetleća bakterija *Photorhabdus luminescens* u probavi

Heterorhabditis bacteriophora, str. 8

Slika 3. Patogeneza i razmnožavanje *S. feltiae* u ličinci šampinjonske mušice, str. 9

Slika 4. Otopine s nematodama i biostimulatorom Kendal Nem prije mješanja, str.15

Slika 5. Postavljanje pokusa, str. 16

Slika 6. Fiksacijske zdjelice s destiliranom vodom i deset IJ entomopatogenih ISO13 i

ISO18, str. 16

Slika 7. Ispitivanje patogenosti preživjelih nematoda, str. 17

Slika 8. Patogenost IJ nakon 72h nije uočena, gusjenice malog voskovog moljca su

započele fazu kukuljenja, str. 22

12. POPIS GRAFIKONA

Graf 1. Broj opisanih vrsta Steinernematidae i Heterorhabditidae od 1920. do 2000. god.,
str. 3

Graf 2. Ukupna prodaja pesticida u EU izražena u tonama, str. 13

Graf 3. Dinamika stope mortaliteta izolata 13 i 18 pri miješanju s biostimulatorom, str. 22

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Sveučilišni diplomski studij, smjer Zaštita bilja

Diplomski rad

Kompatibilnost entomopatogenih nematoda i biostimulatora

Nikolina Forić

Sažetak: Suvremena poljoprivredna proizvodnja zahtjeva poticanje razvoja ekološki prihvatljivih metoda u suzbijanju štetočinja što ukazuje na nužnost uvođenja patogenih, korisnih grabežljivih ili parazitskih organizama u postojeće integrirane sustave zaštite biljaka. Entomopatogene nematode su se pokazale kao značajna biološka komponenta kojom se suzbija veliki broj ekonomski značajnih štetnih kukaca. Njihova djelotvornost može se povećati miješanjem s kompatibilnim kemijskim ili biološkim sredstvima za zaštitu bilja. U ovom radu ispitan je utjecaj biostimulatora Kendal Nem na dvije vrste entomopatogenih nematoda: *Steinernema feltiae* i *Heterorhabditis bacteriophora*. Kompatibilnost nije potvrđena zbog toga što ispitivani biostimulator izaziva visoku stopu mortaliteta obje vrste nematoda.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: izv.prof.dr.sc. Ivana Majić

Broj stranica: 35

Broj grafikona i slika: 11

Broj tablica: 8

Broj literaturnih navoda: 35

Broj priloga: -

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: entomopatogene nematode, biološka kontrola, biostimulator, kompatibilnost

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

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

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira Preloga 1, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Graduate thesis

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

University Graduate Studies Plant production, course Plant Protection

Compatibility of entomopathogenic nematodes and biostimulants

Nikolina Forić

Abstract: Modern agricultural production comprises constant development and application of ecologically sound methods in control of insect pests by introduction of pathogenic, beneficial predatory and/or parasitic organisms in IPM programs. Entomopathogenic nematodes are proven lethal parasites of many important agricultural pests. their efficacy ld be improved by mixing with other compatible agrochemicals and/or biocontrol agents. In this study, we tested compatibility of mixing two entomopathogenic species *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* with biostimulator Kendal Nem. Both species of entomopathogenic nematodes are not compatible with tested biostimulators, since high mortality rate was observed already after 24h of incubation.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: PhD Ivana Majić, Associate Professor

Number of pages: 35

Number of figures: 11

Number of tables: 8

Number of references: 35

Number of appendices: -

Original in: Croatian

Key words: entomopathogenic nematodes, biological control, biostimulants, compatibility

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. PhD Emilija Raspudić, Full Professor, chair
2. PhD Ivana Majić, Associate Professor, mentor
3. PhD Ankica Sarajlić, Assistant Professor, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1, Osijek