

Utjecaj biostimulatora i mineralne gnojidbe na bioraznolikost i strukturu zajednice nematoda u pšenici

Ninković, Gloria

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:151:407650>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-26**



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](#)



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Gloria Ninković

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer: Zaštita bilja

**UTJECAJ BIOSTIMULATORA I MINERALNE GNOJIDBE NA
BIORAZNOLIKOST I STRUKTURU ZAJEDNICE NEMATODA U PŠENICI**

Diplomski rad

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Gloria Ninković

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer: Zaštita bilja

**UTJECAJ BIOSTIMULATORA I MINERALNE GNOJIDBE NA
BIORAZNOLIKOST I STRUKTURU ZAJEDNICE NEMATODA U PŠENICI**

Diplomski rad

Povjerenstvo za obranu i ocjenu diplomskog rada:

1. Prof.dr.sc. Brigita Popović, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Mirjana Brmež, mentor
3. Dr.sc. Josipa Puškarić, član

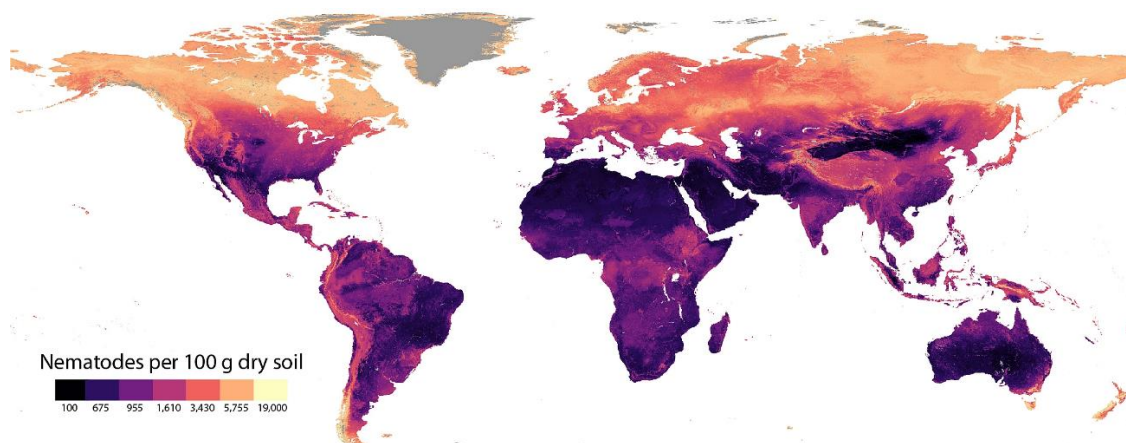
Osijek, 2023.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Cilj istraživanja | 2 |
| 2. PREGLED LITERATURE..... | 3 |
| 2.1. Nematode | 3 |
| 2.2. Morfologija nematoda..... | 4 |
| 2.3. Ekologija i biologija nematoda | 10 |
| 2.4. Utjecaj biotskih i abiotskih čimbenika..... | 11 |
| 2.5. Trofičke grupe..... | 13 |
| 2.5.1. Fitoparazitne nematode | 14 |
| 2.5.2. Bakterivore | 16 |
| 2.5.3. Fungivore | 16 |
| 2.5.4. Omnivore..... | 17 |
| 2.5.5. Predatori | 17 |
| 2.6. Nematode kao bioindikator..... | 17 |
| 2.7. Indeks zrelosti tla (<i>Maturity index</i> - MI)..... | 18 |
| 2.8. Indeks biljnih parazita (<i>Plant parasitic indeks</i> – PPI)..... | 21 |
| 2.9. Indeksi hranidbenog lanca | 21 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 22 |
| 4. REZULTATI..... | 25 |
| 3.1. Broj rodova nematoda i ukupnu brojnost nematoda | 25 |
| 4.2. Rezultati analize trofičkih grupa nematoda | 26 |
| 4.3. Rezultati nematoloških indeksa | 30 |
| 5. RASPRAVA..... | 35 |
| 6. ZAKLJUČAK | 37 |
| 7. POPIS LITERATURE..... | 38 |
| 8. SAŽETAK | 44 |
| 9. SUMMARY | 45 |
| 10. POPIS SLIKA..... | 46 |
| 11. POPIS GRAFIKONA | 47 |
| TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA | |
| BASIC DOCUMENTATION CARD | |

1. UVOD

Nematode su organizmi iz skupine beskralježnjaka, jedne od najstarijih, najbrojnijih i najraznovrsnijih vrsta organizama na svijetu, međutim vrlo su slabo proučene. Prema Lambsheadu (1993.) četiri od pet višestaničnih životinja na Zemlji su nematode te se pretpostavlja da ih ima preko 1.000.000 vrsta. Nematode su uspješno prilagođene različitim geografskim područjima i uvjetima života – od morskih do slatkih voda, kopna na kojem sežu do dubine tla od 60 cm, od polarnih do tropskih krajeva, od najnižih nadmorskih visina pa sve do najviših. Nematode čine oko 90% svih živih bića na dnu oceana (<http://en.wikipedia.org>). Njihova brojnost u tlu je izuzetno velika te u nekim tlima na jedan kubni centimetar može biti prisutno na stotine nematoda. U šaci zemlje može se naći oko 50 različitih vrsta nematoda. Slika br. 1 prikazuje globalnu zastupljenost nematoda na određenom profilu staništa.



Slika 1. Prisutnost nematoda u svijetu, izbrojene u 100 g suhog tla

Izvor: <https://ecoevocommunity.nature.com/>

Na brojnost i dinamiku nematoda u tlu utječu razni čimbenici: temperatura i vlaga tla, prozračnost tla, prisustvo CO₂, pH tla (Ivezić i sur., 1990.), sposobnost i brzina reprodukcije, godišnja doba (Powers i McSorley, 1994.), biljni domaćin (Freckman i Caswell, 1985.) i količina organske tvari u tlu, povijest tla, prirodni neprijatelji nematoda i sl. Najveća brojnost nematoda u tlu je od travnja do rujna, a najmanja od studenog do siječnja.

Nematode su se sedamdesetih godina počele koristiti kao bioindikatori (Neher, 2001.) te se do danas koriste kao takve budući su prisutne u raznim ekosustavima, prve reagiraju na najmanje promjene u tlu (Brmež, 1999.; Ivezić i sur., 2000.; Brmež, 2004.), lako se uzorkuju

i identificiraju (Benković-Lačić, 2012.). Također, nematode doprinose ekosustavu tako što sudjeluju u procesima kao što je opskrbljivanje biljaka hranom, vodom i zrakom, ali i reguliranjem štetnika i bolesti (Wall, 2004).

Ovisno o vrsti, nematode dijelimo na korisne i štetne. Štetne u poljoprivredi uzrokuju razna oštećenja, a neke djeluju kao vektori virusa (npr. *Anquina tritici* Steinb., *Xiphinema index* Thorne te rodovi *Meloydogine*, *Pratylenchus* i sl.), a korisne su npr. entomopatogene nematode (*Steinernema* spp. I *Heterorhabditis* spp.) (Poljoprivredna enciklopedija, 1970.).

Suvremena poljoprivreda sve više nastoji izbjeći konvencionalni pristup gospodarenju i teži pronalasku alternativnih rješenja sintetskim gnojivima kako bi ispoštovala promjene međunarodnog prava i potrebe potrošača za hranom bez mogućih toksičnih rezidua. Mikrobn (mikorize i rizobakterije koje potiču rast biljaka: *Azotobacter*, *Azospirillum* i *Rizhobium* spp.) i nemikrobni (huminske tvari, silicij, hidrolizat proteina životinjskog i biljnog porijekla te ekstrakti makro- i mikro algi) biostimulatori pokazali su se kao održiva i efikasna alternativa kemijskim pripravcima kroz doprinos okolišu, bioraznolikosti, ljudskom zdravlju i gospodarstvu (Rouphael i Colla, 2020.).

1.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je bio utvrditi utjecaj različitih načina gnojidbe na bioraznolikost nematoloških zajednica u usjevu pšenice kroz dodatak biostimulatora i kemijskih pripravaka. Izračunati su postotci trofičkih skupina i nematološki indeksi

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Nematode

Nematode su mikroskopski organizmi iz skupine beskralježnjaka (oblići), a naziv su dobile prema obliku tijela (grč. *nêma*, *nêmatos* - nit ili konac; i *eidōs* - slično (Siddiqi, 2000.)). Rasprostranjene su širom svijeta i naseljavaju gotovo sve biotope – od morskih do slatkih voda, kopno do dubine tla 60 cm od polarnih do tropskih krajeva, od najnižih nadmorskih visina pa sve do najviših – zbog čega predstavljaju dominantu skupinu mikrofaune (Ax, 2003.; MsSorley, 2003.). Prisutne su i na mjestima rijetke faune gdje su uvjeti za život vrlo nepovoljni, poput polarnih krajeva, dna jezera, a neki izvori govore da nematode zauzimaju oko 90% živih organizama na dnu oceana (<http://en.wikipedia.org>). Neki izvori govore da postoji 40 tisuća do 10 milijuna vrsta nematoda (Yeates i sur., 2009.; Yeates i Boag, 2006.), dok drugi izvori (Lambshhead, 1993.; Bongers i Ferris, 1999.) navode kako nematode zapravo zauzimaju četiri petine svih višestaničnih životinjskih organizama te njihova brojnost seže preko milijun vrsta. Smatra se da 90 % organizama u oceanima i 80 % ukupnih organizama u tlu čine upravo nematode (Anderson, 2000.). Danas je opisano oko 20 000 vrsta nematoda koje žive u tlu (Bongers i Ferris, 1999.; Ax, 2003.). Bongers i Ferris (1999.) objavljuju kako se u jednom m² tla može naći oko milijun nematoda. Prema istraživanju provedenog na misiji STS-107 svemirskog shuttle-a Columbia 2003., nematode (*Caenorhabditis elegans*) su preživjele ponovni ulazak na Zemlju te se vjeruje da je to prvi poznati oblik života koji je, gotovo nezaštićen, preživio atmosferski pad na Zemljinu površinu (Szewczyk i sur., 2005.).

Nematode su vrlo bitan čimbenik u hranidbenom lancu tla, zaslužne za razlaganje organske tvari životinjskog i biljnog podrijetla te kruženju tvari u tlu (Brmež i sur., 2019.). Izlučivanje nematoda može osloboditi do 27 % topljivog dušika u prirodnim ekosustavima i agroekosustavima (Ekschmitt i sur., 1999.). Mogu biti slobodnoživuće ili pak parazitne vrste koje napadaju biljke, životinje i ljude (Olsen 1974.). Paraziti ljudi i životinja mogu veličinom varirati od milimetarskih veličina (*Trichinella spiralis* Owen) do preko 1 m (*Dracunculus medinensis* Linnaeus). Mogu uzrokovati bolest zvanu trihinelozu (*Trichinella spiralis* Owen), elefantiaza (*Wuchereria bancrofti* Cobbold) „riječno sljepilo“ (*Onchocerca* spp.) i ostalo.

2.2. Morfologija nematoda

Glavne karakteristika nematoda jest njihovo izduženo, bilateralno simetrično, nesegmentirano tijelo. Nemaju pigmente i stoga su prozirne do blijedožute boje. Oblik tijela varira prema vrstama. Većinski su crvolikog oblika, a ujedno mogu biti cilindrične, filiformne i vretenaste forme. Pojedine vrste ženki mogu poprimiti cistolik izgled (Slika 2) i kao takve ih razlikujemo kruškolikog, okruglastog i limunastog oblika.



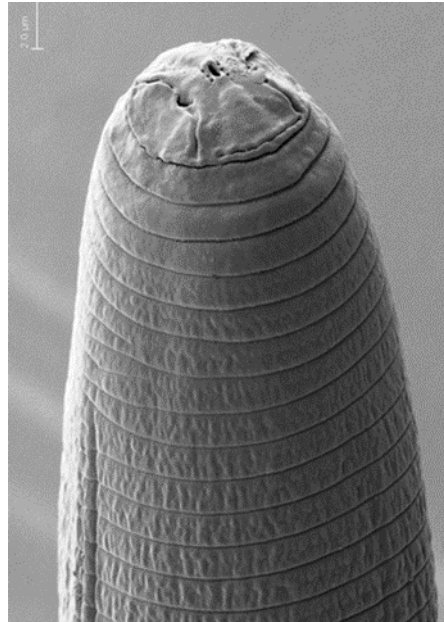
Slika 2. Cistolika nematoda *Globodera rostochiensis* (zlatna krumpirova nematoda)
Izvor: <https://www.cabidigitallibrary.org/>

Tijelo im je sastavljeno od kutikule, epiderme i uzdužnih mišićnih vlakana, nemaju razvijen dišni sustav i krvotok, ali imaju živčani sustav sa živčanim prstenom u predjelu ždrijela. Nemaju posebno razvijene organe za disanje, pa je tu ulogu preuzela kutikula. Dišu dužinom cijelog tijela, a količina potrebnog kisika ovisi o visini temperature, veličini i pritisku kisika (Ivezić, 2014.).

Kutikula predstavlja površinski sloj koji se sastoji od poprečne anulacije. Razmaknute bočne uzdužne linije tvore bočna polja, odnosno prstenove (Slika 3). Prstenovi su međusobno odvojeni anulima čija se dubina uvelike razlikuje, a njihova udaljenost čini širinu prstena. Corbett i Clark (1983.) proučavali su anulacija tijela *Pratylenchus* spp. i utvrdili niz od najšireg prstena u *P. andinus* (1,6 μm) i *P. fallax* (1,4 μm) do najužeg kod *P. zaeae* (0,9 μm). Međutim, mala dubina anulacije tijela može dati zaglađeniji izgled, npr. *P. thornei* vjerojatno ima najfiniji prsten; prstenovi su 1,3-1,6 μm odvojeni, a duboki samo 0,22-0,33 μm .

Iako većina nematoda dijeli slične karakteristike u izgledu, ipak se značajno razlikuju u veličini, što predstavlja jedno od glavnih obilježja diferenciranja. Mikroskopskih su dimenzija. Duljina tijela varira od 400 μm do 5 mm, a širina između 15-20 μm . Međutim,

postoje iznimke poput *Placentonema gigantissima* koja parazitira reproduktivne organe ženke kita, a veličinom može dosegnuti i do 8,4 m duljine (Gubanov, 1951.)



Slika 3. Anulacija nematoda
Izvor: <https://link.springer.com/>

Nematode se razmnožavaju spolnim putem. Mogu biti hermafroditi ili se razmnožavaju partenogenetski, a postoje i vrste koje su interseksualne (Oštrec, 1998.). Omjer ženki i mužjaka je uglavnom izjednačen osim kod nekih (*Pratylenchus thornei*) gdje ženke zauzimaju veći dio populacije (Ryss i sur., 2022.).

Građene su iz tri osnovna dijela, a to su prednji, srednji i stražnji dio (Slika 4).

U prednjem dijelu nalazi se glava na kojoj je vidljiv usni ustroj prilagođen načinu ishrane pojedine vrste nematode, sastavljen od usne okružene sa šest usnica (Ivezić 2014.), na koji se nastavlja jednjak. Nematode koje se hrane biljnim korijenjem i njegovim izlučevinama (fitoparaziti) u ustima imaju poseban organ – hitiniziranu bodlju ili stilet kojim probijaju biljnu stanicu i sišu sokove iz različitih dijelova biljke. Ukoliko se hrane na zaraženim biljkama, vrlo lako prenose viruse na zdrave biljke i tako postaju vektorom virusa. Smatra se da njihova klasa predstavlja jednu od najbrojnijih grupa živih bića uopće, ali je vrlo slabo proučena.



Slika 4. Građa tijela nematoda

Izvor: <https://hr.izzi>.

Stilet je građen od mišića zvanih protaktor i retraktor. Protaktor potiče stilet iz usnog otvora, a retraktor ga vraća nazad. Postoje dva oblika stileta koje dalje definiraju pripadnost redu nematoda. Razlikujemo pravi stilet ili stomatostilet (*Tylenchidae*) (Slika 5) koji sadrži guke i odontostilet (*Dorylaimidae*) (Slika 6) koji ne sadrži guke (Ivezić, 2014.). Stilet, osim fitoparazita mogu imati nematode koje se hrane gljivama (fungivore) te one raznolike ishrane (omnivore), ali drugačije konstrukcije (Brmež i sur., 2019.).

Usta nematoda također mogu imati jednostavnu šupljinu u ustima s izraštajima na glavama radi lakšeg hvatanja plijena (bakterivore), no postoje i skupine (predatori) koje imaju veliku usnu šupljinu sa velikim zubom i/ili više manjih zubića (Slika 7) (Brmež i sur., 2019.).

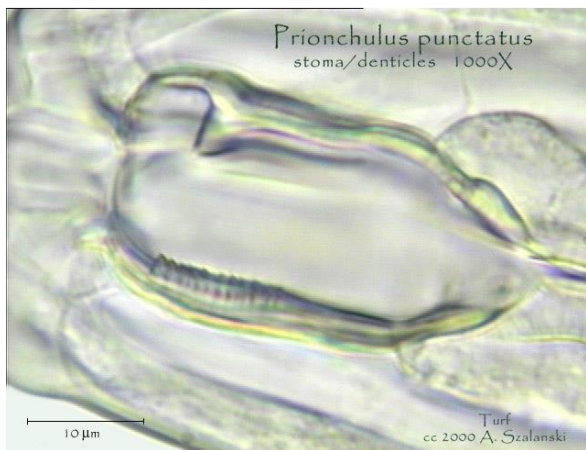
Duž cijelog tijela nematode su prekrivene brojnim osjetilnim čekinjama i papilama (Slika 8) koje omogućuju osjet dodira. Na glavi se nalaze amfidi (Slika 8), lateralno kod usnog ustroja, odmah iza osjetilnih čekinja. To su kemoreceptorni, čulni organi sastavljeni od mnoštva nervnih stanica.



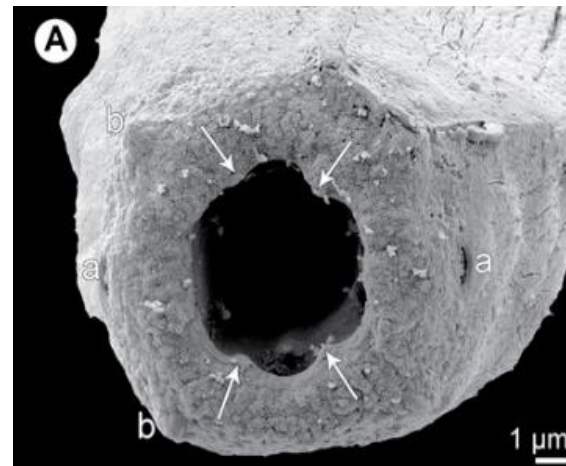
Slika 5. Pravi stilet ili stomatostilet (*Hoplolamus*)
Izvor: <https://www.forestryimages.org>



Slika 6. Odontostilet (*Xiphinema*)
Izvor: <https://www.ipmimages.org>



Slika 7. Usna šupljina sa zubom i zubićima predatora
Izvor: <https://nematode.unl.edu/>

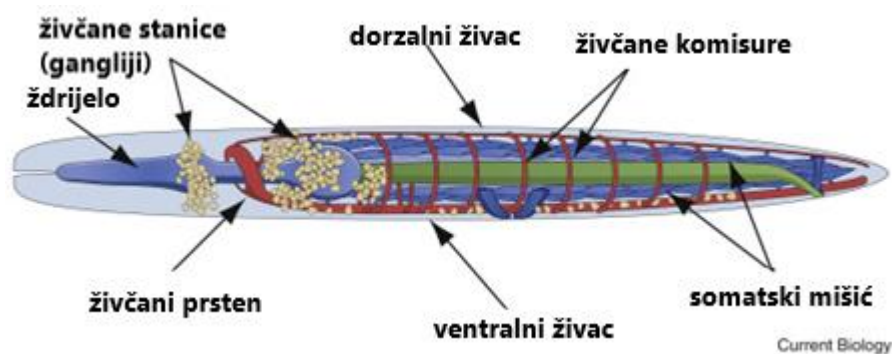


Slika 8. a) Amfidi, b) Papile
Izvor: <https://nl.wikipedia.org/wiki/Amfide>

U srednjem dijelu tijela nalazi se probavni, živčani i reproduktivni sustav. Nemaju želudac, a ždrijelo je izravno povezano s crijevom, bez mišića, koje zauzima glavninu stomaka. Crijeva proizvode enzime potrebne za preradu i također upijaju hranjiva dobavljena iz jednjaka koje dijelom koriste za metabolizam, a višak odstranjuju. Probavni sustav je podijeljen u tri dijela – prednji, srednji i stražnji dio (Ivezić, 2014.). Prednji dio ili stomodeum započinje usnim otvorom i nastavlja se do jednjaka. Između jednjaka i prednjeg crijeva nalazi se kardijalni prsten koji sprječava vraćanje hrane nazad u jednjak. Srednji dio ili mesenteron počinje jednjakom i proteže se gotovo cijelom dužinom nematode, a stražnji dio ili proctodeum je vrlo kratak, prekriven je kutikulom i tako tvori rektum koji kroz anus izbacuje otpadne tvari (Barnes, 1980.). Lokacija anusa ovisi o vrsti, ali u globalu je smješten

iznad vrha repa. Višak dušika se izlučuje u amonijačnom obliku (NH_4^+) kroz tjelesnu stijenku te mu nisu potrebni određeni organi (Barnes, 1980.).

Na kraju prednjeg dijela nalazi se živčani prsten (Slika 9) koji ima ulogu mozga i okružuje ždrijelo (Barnes, 1980.). Iz prstena se dalje nastavljaju šest živčanih niti koje se protežu dužinom cijelog tijela; jedna velika ventralna, jedna manja dorzalna i po sva para sublateralnih niti (Huang i Guo, 2021.). Dorzalni živac služi za motoričku kontrolu, pomoću lateralnih živaca ostvaruju mogućnost osjeta, dok ventralni obuhvaća obje kombinacije (Barnes, 1980.). Fazmidi su slične strukture poput amfida koji se nalaze u prednjem dijelu tijela, no fazmidi su smješteni bočno u središnjem dijelu tijela, blizu analnog otvora, s kojim završava središnji dio (Ivezić, 2014.).

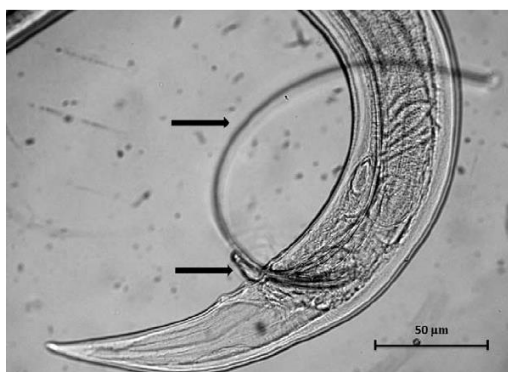


Slika 9. Živčani sustav nematoda
Izvor: <https://www.sciencedirect.com/>

Većina nematoda su razdvojenog spola. Međutim, neke poput *Caenorhabditis elegans* mogu biti androdiodomne, a sastoje se od hermafroditnih jedinki i rijetkih mužjaka. Oba spola imaju spolne žlijezde. Prema Barnes (1980.), kod mužjaka se spermiji proizvode u testisima koji vode sjemenom mjehuriću nakon čega, za vrijeme spolnog odnosa, spermiji prelaze u ejakulacijski mišić zvani spikula (Slika 10) ili bursa koji izlazi iz kloake i zatim ulazi u ženski genitalni organ, nakon čega slijedi oplodnja. Smatra se da je sperma nematoda jedina eukariotska stanica bez globularnog proteina G-aktina (Barnes, 1980.). Mužjaci su obično dosta manji veličinom od ženki, što upućuje na spolni dimorfizam i u prirodi ih se nalazi brojčano manje u odnosu na ženke.

Kod ženki se jajne stanice proizvode u jajnicima koji vode jajovodu (kod hermafrodita se prvo ulaze u spermateke), a zatim u žljezdanu maternicu na koju se nastavlja mišićna rodnica (vagina) koja s prednje strane čini vulvu (Barnes, 1980.). Vulva (Slika 11) može poslužiti u

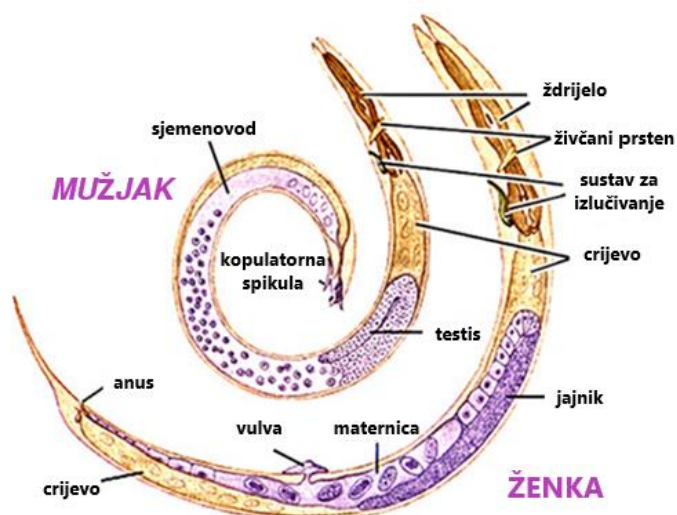
određivanju vrste nematoda jer se njezina pozicija razlikuje među vrstama. Razmnožavaju se najčešće spolno, no neke jedinke su sklone samooplodnji. Najčešće su oviparne, no neke mogu biti viviparne. Na Slici 12 prikazan je središnji dio ženke i mužjaka te njihove razlike u spolu.



Slika 10. Muški spolni organ – Spikula
Izvor: <https://www.researchgate.net>



Slika 11. Ženski spolni organ – vulva
Izvor: <https://www.researchgate.net>



Slika 12. Građa tijela nematoda
Izvor: <https://quizlet.com>

Stražnjem dijelu tijela pripada rep. On se nalazi iza analnog otvora i može biti različitih dimenzija te sadržavati razne izraštaje. Rep također može poslužiti u determinaciji nematoda, budući da je svojstven pojedinačnoj vrsti (Oštrec, 1998.). Prema Barnes R. G. (1980.), mužjaci često imaju karakteristično povijen ili lepezasti rep.

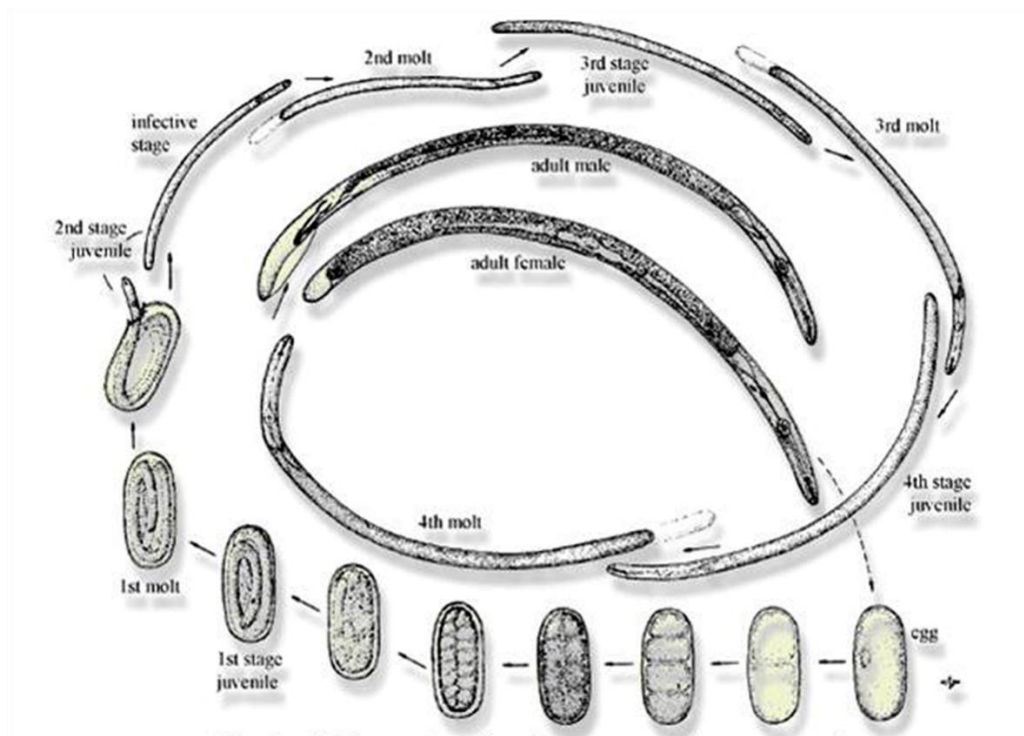
2.3. Ekologija i biologija nematoda

Nematode su neizostavni sudionici biologije tla, a nazočne su i na mjestima koje opisuje rijetka prisutnost života zbog svoje, raznolike prehrane i stila života. Najučestalije su u tlu bogatom humusom. Najveći broj nematoda je oviparno, odnosno izlaze iz jajeta i slični su odraslom obliku, a razvoj jedne takve generacije vrlo je kratak i odvija se kroz šest životnih faza: jaje, četiri juvenilna stadija i odrasli (imago). Viviparne nematode imaju nešto drugačiji razvojni ciklus gdje iz ženke izravno nastaju mlade ličinke, poput *Trichinella spiralis* i *Dracunculus medinensis* (NVBDPC, 2023.). Svojstveno nematodama mužjaci imaju kraći životni vijek od ženki (Hugot, 2001.). Većina nematoda završava životni ciklus za 3-4 tjedna, kod nekih i 8 tjedana, no razvoj ovisi o uvjetima u kojima se nematode nalazi kao što su optimalna temp. (od 5 – 30°C) i vlaga. Iznad 40°C u vlažnim sredinama nematode ugibaju, ali brojne zato preživljavaju vrlo niske temperature, do čak -40°C.

Prije polaganja jaja, vulva se redovito otvara i zatvara i učestalost se povećava kako se približava početak polaganja jaja (Zunke, 1990.). Jaje se brzo izbacuje kada izroni polovica jajeta, ali nije poznato uzrokuje li to mišićna kontrakcija stijenke tijela, unutarnji hidrostatski tlak ili kontrakcija vulve. Neka jajašca se mogu formirati i bez embrionalnog stadija, što znači da plod možda još nije razvijen, no u većini slučajeva situacija nije takva. Jaja štiti vanjska ovojnica koja se oblikuje još u maternici (Barnes, 1980.). Kod slobodnoživućih nematoda, u jajima se tvori embrij iz kojeg se razvije ličinka prvog stupnja. Ona nalikuje odraslima, ali ne posjeduje razvijeni reproduktivni sistem. Slijedi njen razvoj do imaga kroz četiri stupnja (Slika 13). Dok je još u jajetu, presvlači se (odbacuje vanjsku tjelesnu stjenku ili kutikulu) i kada je spremna izaći iz jajeta, prestaje s kretanjem te izlazi kao ličinka drugog stupnja s kojom završava embrionalni, a počinje postembrionalni stadij. Zatim se dalje presvlači u ličinku trećeg i zatim četvrtog stupnja, kojemu se počinju formirati organi za razmnožavanje. Od formiranja drugog juvenilnog stadija, ličinke su crvolike, pokretne i infektivne te mogu praviti štete na usjevima.

Kod nekih nematoda, primjerice *Paratylenchusa*, odnosno igličastih ili pin nematoda, ukoliko nastupi stresno razdoblje i nema prisutnog domaćina ili su uvjeti suše i dr., igličaste nematode formiraju, tzv. trajni/dauer stadij ili stadij mirovanja (uglavnom četvrti stadij) koji im pomaže u održavanju razine inokuluma tijekom stresnog razdoblja (Wood, 1973.) i tako zaustavljaju svoj daljnji razvoj (Majić i sur., 2017.). Ličinka četvrtoga stadija pruža adaptivnu prednost pri ekstremnim abiotičkim i biotičkim uvjetima od ostalih ličinki i

odraslih, nema razvijen stilet i ne hrani se te nije aktivna sve do pojave optimalnih uvjeta (Ishibashi i sur., 1975.). Taj proces se naziva anabioza. Nakon četvrtog presvlačenja, ličinke poprimaju oblik imaga, mužjak i ženka, te postaju spolno zreli i sposobni za kopulaciju. Ženke odlažu jajašca u korijenje ili tlo, nakon čega ugibaju.



Slika 13. Životni ciklus nematoda
Izvor: <https://pnwhandbooks.org>

Nematode se uz klasičan način mogu razmnožavati na još njih nekoliko (Bell, 1982.). Na primjer, nematode *Heterorhabditis* spp., prolaze kroz proces zvan endotokia matricida, odnosno intrauterino rođenje koje uzrokuje smrt majke (Johnigk i Ehlers, 1999.). S druge strane, hermafroditi svoja samooplođena jaja ostavljaju u maternici do izleganja ličinki. One potom proždru roditeljsku nematodu. To se događa kada okolnosti u kojima se nalaze ne osiguravaju dostatan izvor hrane (Johnigk i Ehlers, 1999.).

2.4. Utjecaj biotskih i abiotskih čimbenika

Nematode su aktivne cijele godine. Prve reagiraju na uznemirenja u tlu, budući da prebivaju u filmu vode oko čestica tla te su u neposrednoj konekciji s otopinama tla. Voda predstavlja

neizostavan segment njihova života te se u njoj hrane, razvijaju i kreću (Bongers i Ferris 1999.). Ličinka pri izlasku iz jaja treba vodu kako bi se mogla dalje kretati do opskrbe hranom. Ako ne može doći do hrane, ugiba. Kako raste vlaga u tlu, tako se povećava i njihova aktivnost (Brmež, 2004.). Također je bitno naglasiti da pri manjoj vlažnosti nematode bolje podnose stresove uzrokovane temperaturom. Stoga, voda direktno utječe na brojnost i dinamiku nematoda u tlu. Osim vode, veliki utjecaj na prisutnost nematoda u tlu ima aeriranost tla, prisutnost CO₂, pH, temperatura tla, biljni pokrov i količina organske tvari u tlu (debljina oraničnog sloja), godišnja doba, povijest ekosustava (pretkultura, način obrade tla i sl.), prirodni neprijatelji nematoda, način života nematoda, pokretljivost, sposobnost i brzina reprodukcije, itd., koje će biti detaljnije objašnjene u ostatku teksta.

Ukoliko tlo nije prozirno i količina vode je previsoka dolazi do nedostatka kisika, čime se populacija većine nematoda smanjuje, dok se neke prilagode (npr. *Hirschmanniella*). Uz kisik, nematode reagiraju na prisutnost CO₂, pH tla te na kemijske elemente u tlu (Ivezić i sur., 1990.). Biljke korijenom izlučuju CO₂ kojeg nematode osjete i tako se približavaju biljkama. Porast mikrobiološke aktivnosti gljiva raste s povećanjem razine kiselosti tla, dok na tlima neutralne pH-reakcije raste prisutnost bakterija. Tako i prisutnost fungivora i bakterivora raste proporcionalno njihovim izvorom hrane, odnosno o pH-reakciji tla (Brmež i sur., 2019.)

Temperatura tla je također važan abiotički čimbenik. Optimalne temperature za biološki razvoj nematoda su između 5 do 30 °C. Temperature iznad 40°C na predjelima umjerene klime uzrokuju smrt nematoda, dok su u tropskim krajevima nematode prilagođene visokim temperaturama te mogu preživjeti i na 50°C (Hunt i sur., 2005). Također postoje vrste koje mogu preživjeti i -40°C. Na brojnost i dinamiku nematoda utječe i izmjena godišnjih doba. Nematode su najaktivnije u razdoblju od travnja do rujna, a vrlo slabo aktivne od studenog do siječnja. Powers i McSorley (1994.) utvrdili su da je raznovrsnost nematoda uvjetovana više godišnjim dobima nego lokalitetom, unatoč razlici istraživanih geografskih područja. Powers i McSorley (1994.) također su dokazali da fitoparazitna nematoda *Tylenchorhynchus sensu lato* bila najbrojnija u periodu bez kiše, s vremenom je broj opadao, a suprotno se povećao broj nematoda iz *Helicotylenchus* i *Criconebella*.

Biljka domaćin također značajno utječe na prisutnost populacije nematoda (Freckman i Cawell, 1985.). Fitoparaziti se prvotno povećavaju ako se na poljoprivrednoj parceli zatekne potencijalni domaćin određene vrste fitoparazitne nematode (npr. pšenica biljni domaćin

Anguini tritici). Uzastopnim uzgojem biljke domaćina, populacija nematoda stagnira i ne povećava se brojnost. Međutim, ako se biljka domaćin ukloni iz uzgoja, populacija biljno parazitnih nematoda će se smanjiti. Nadalje, Seinhorst, J.W. (1965.) u svome radu opisuje povezanost fitoparazita i domaćina te je utvrdio kako pojedini ekološki čimbenici i razvoj poljoprivredne kulture pridonose dinamici populacije nematoda.

Da prirodni neprijatelji također utječu na populaciju nematoda u tlu, obznanili su u svom radu Freckman i Caswell (1985.). Navode kako rast populacije nematoda određen konkurentnim djelovanjem nematoda i drugih organizama sa sličnim zahtjevima za preživljavanjem, npr. parazitima i predatorima. Prema Yeates (1982.), za raznolikost vrsta nematoda u tlu, vegetacija i kultivacija jednake su važnosti i klimatski te pedološki čimbenici. Struktura tla direktno utječe na dinamiku nematoda budući da se i kreću u filmu vode oko čestica tla. Kompaktnija tla otežavaju pokretljivost nematoda (Ivezić, 2014.). Brojnije su u gornjim slojevima tla nego u dubljim. Najviše ih se može naći u razini od 0 do 30 cm dubine tla, iako ih se može naći i na dubini od 7 do 8 metara, ali u znatno manjem broju (Ivezić, 2014.).

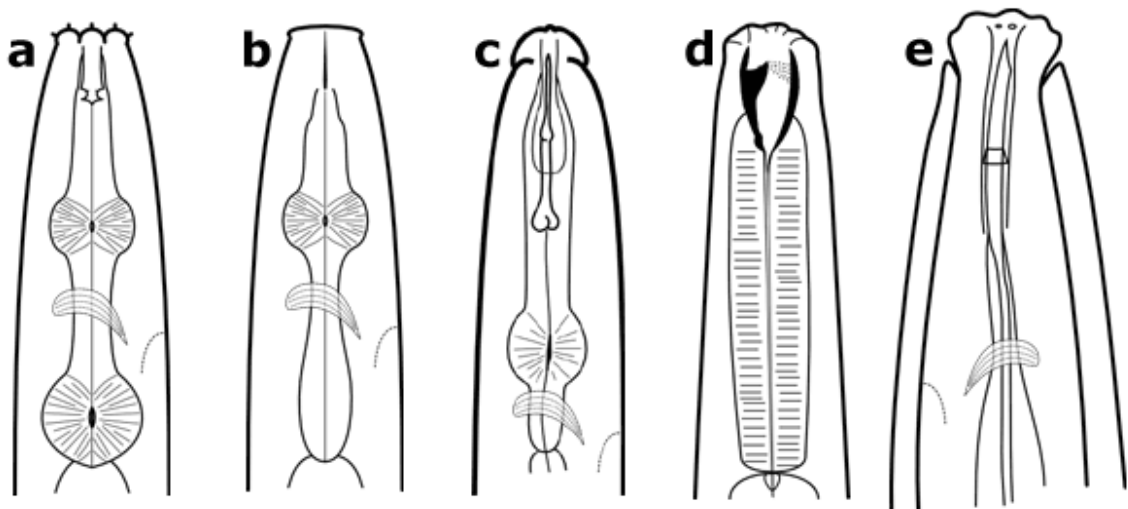
Iz prethodnog teksta, vidljivo je kako zapravo velik broj činitelja utječe na dinamiku i brojnost nematoda, zbog čega se smatraju vrlo osjetljivima na podražaje i uznemirenja okoline. Kao takve, imaju izuzetno korisnu ulogu u okolišu, posebice u poljoprivredi, jer upućuju na kvalitetu i biološku raznolikost tla. Sastav zajednice nematoda i njihova funkcionalna raznovrsnost ukazuje na razinu onečišćenosti ili stabilnosti tla. Stoga su nematode svrstane u bioindikatore tla o kojima će biti govora u nastavku rada.

2.5. Trofičke grupe

Nematode su usko vezane s ostalim mikrobiološkim organizmima tla, bilo da se radi o organizmima kojima se hrane (bakterije, gljive, biljke, itd.), kompeticiji za hranjiva (protozoe, rotifere), grabežljivcima kojima su nematode izvor hrane (protozoe, gljive, grinje, predatorske nematode) i dr. (Brmež i sur., 2019).

Usporedno na ostatak mikro i mezofaune tla, nematode izdvaja morfologija usnog ustroja čija se struktura i izgled prilagodio načinu prehrane pojedine skupine nematoda. Nematode su s vremenom evoluirale u načinu ishrane, te su iz jednostavnog oblika (ishrana bakterijama) prešle u kompleksnije oblike, poput parazita (Benković-Lačić, 2012.). Radi

lakše determinacije i klasifikacije nematoda, osmišljene su trofičke grupe koje ekolozima uvelike koriste u pozicioniranju nematoda u hranidbenoj mreži tla (Brmež, 2004.). Utvrđeno je da postoji više od 15 trofičkih grupa po načinu ishrane nematoda (Yeates i sur. 1993.), ali u poljoprivredi su najraširenije nematode koje se hrane bakterijama (bakterivore), gljivama (fungivore), različitim izvorima hrane (omnivore), drugim nematodama (predatori) i biljnim materijalom (fitoparaziti) (McSorley, 1997.) koje su prikazane na Slici 14 te one čine temeljnih pet opće prihvaćenih trofičkih grupa. Među njima, najbrojniji su fitoparaziti i bakterivore (Brmež, 2004.; McSorley, 1997.). S povećanjem populacije omnivora, fungivora i predatora s obzirom na bakterivore i fitoparazite generira se stabilnost i povećava bioraznolikost tla (Wasilewska, 1979.). Nematode istog roda ili porodice u globalu dijele istu trofičku grupu, ali postoje vrste koje pripadaju porodici u kojoj se većinom nalaze fitoparazitske nematode, ali pojedine vrste mogu se hraniti i gljivama, npr. *Tylenchidae* (Brmež, 2004.).



Slika 14. Struktura usnog ustroja nematoda prema načinu ishrane: a) bakterivore, b) fungivore, c) fitoparaziti d) predatori, e) omnivore

Izvor: Ed Zaborski, University of Illinois, <https://eorganic.org>.

2.5.1. Fitoparazitne nematode

Najznačajnija skupina nematoda u poljoprivredi su fitoparazitne nematode jer se mogu naći u različitim kulturama i tvore velike ekonomske štete na usjevima diljem svijeta, zbog čega su najproučenija skupina nematoda. Prema Američkom fitopatološkom društvu (American Phytopathological Society, APS), procjenjuje se da su ekonomski gubitci u poljoprivrednom

sektoru uzrokovani nematodama dosegli razinu od 14% ukupnih svjetskih prinosa što je gotovo 125 milijardi dolara godišnje (Chitwood, 2003.).

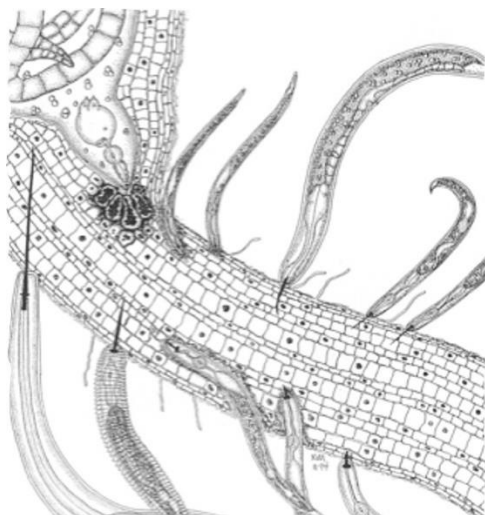
Fitoparazitne nematode postupno su se adaptirale u ishrani kroz evoluciju iz slobodno-živućih nematoda (Siddiqi, 2000.). Hrane se biljnim korijenjem i njegovim izlučevinama, a ujedno ih se smatra i primarnim izlagačima (Brmež i sur., 2019). Uglavnom su crvolikog oblika, ali pojedine ženke nekih fitoparazita nematoda poprimaju okruglasti oblik (npr. ženke cista i korijenskih kvržica). Zajednička karakteristika svih fitoparazitnih nematoda je postojanje stileta. On se nalazi u stomi ili ustima, a može biti stomatostilet (pravi) ili odontostilet. Unutar stileta nalazi se kanal kroz koji prolaze izlučevine i hrana. Stiletom probijaju stijenku stanice domaćina i ispuštaju enzime kojim sadržaj stanice prethodno djelomice razgrade prije nego što ga unesu u organizam. Tako, osim što stvaraju primarne štete na biljci, mogu prenijeti virus ili drugi organizam koji će produžiti degradaciju biljke.

Prema životnom ciklusu i načinu hranjenja fitoparazitske nematode dijelimo u tri skupine: ektoparaziti, endoparaziti i semiendoparaziti.

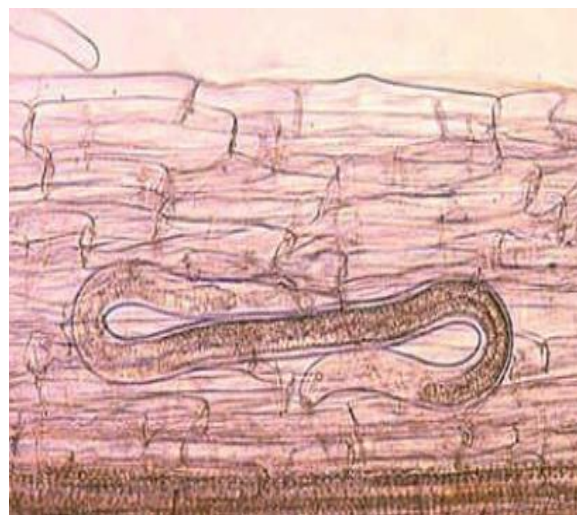
Ektoparaziti (Slika 15) se hrane na površini korijena stanicama koje su u dohvat stileta i ostaju u tlu. Migratorni ektoparaziti se kreću od stanice do stanice i stiletom ih probijaju, bez ulaska u tkivo korijena (npr. *Xiphinema spp.*), dok sedentorni ektoparaziti djelomično ulaze u korijen, odnosno samo glava ostane unutar korijena kako bi fiksirala mjesto ishrane, a tijelo ostaje vani (npr. *Tylenchulus semipenetrans*). Zahvaćenost stanica ovisi o veličini i jačini prodiranja stileta te o mekoći ili tvrdoći korijenskog tkiva (Brmež i sur., 2019.).

Endoparaziti (Slika 16) potpuno prodiru u biljku, čitavim tijelom, i u njoj ostaju cijeli ili većinu života. Migratorni endoparaziti hrane se prolaskom kroz tkivo, inter i intracelularno, vraćaju se u tlo i odlaze do novog korijena po želji. Rezultat njihovog djelovanja su nekrotične lezije (npr. *Pratylenchus spp.*). Sedentorni endoparaziti prolaze kroz korijenje do stanice u kojoj će se nastaniti i u njoj ostaju. Rezultat njihove prisutnosti jest hipertrofija stanica (npr. *Meloidogyne spp.*). Semiendoparaziti provode samo dio svog života prednjim dijelom unutar biljke (*Globodera* i *Heterodera*) (Brmež i sur., 2019.).

Nematode koje napadaju nadzemne dijelove biljaka mogu biti ili ektoparaziti ili endoparaziti u različitim točkama svoje životne povijesti. Simptomi parazitiranja ovih nematoda na biljkama pojavljuju se kao kloroza, zaostajanje biljke u razvoju i ostalo, što se vrlo lako može pripisati drugim biotskim i abiotskim činiteljima.



Slika 15. Ektoparazitne nematode
Izvor: <https://bpp.oregonstate.edu/>



Slika 16. Endoparazitne nematode
Izvor: <http://repository.kln.ac.lk/>

2.5.2. Bakterivore

Bakterivore imaju jednostavan usni ustroj unutar kojeg se nalazi usna šupljina poput cijevi, prilagođena ishrani bakterijama. Na usnama imaju razne izraštaje i papile koje služe lakšem hvatanju plijena, a ujedno i pomažu pri determinaciji (Nicholas, 1984.). Prisutne su na tlima bogatim humusom (Brmež, 2004.). Vrlo su osjetljive na uznemirenja tla, stoga služe kao izvrsni bioindikator onečišćenja tla. Ujedno su vrlo bitni kao sekundarni razlagači tla imaju ključnu ulogu u hranidbenom lancu. Važni su indikatori prisutnosti mikroorganizama te mineraliziranja dušika u tlu, kao i u kolonizaciji rizobakterija u tlu (Brmež i sur., 2019.).

2.5.3. Fungivore

Fungivore su trofička skupina koja u usnom ustroju također ima stilet, poput fitoparazita i omnivora. Razlikuju se po tome što se fungivore hrane isključivo hifama, micelijem i konidijama saprofitskim i parazitskim (napadaju biljke) gljivama. Gljive preferiraju tla niže pH-reakcije, stoga povećanje prisutnosti populacije fungivora ukazuje na povećanje kiselosti pH-reakcije tla, koje može biti uzrokovano dodavanjem mineralnih gnojiva (Sohlenius i Wasilewska, 1984.). Visoka prisutnost fungivora javlja se u listopadnim ili crnogoričnim šumama. Najčešće fungivore u tlima su *Aphelenchus* sp. i *Aphelenchoides* sp. (Brmež i sur., 2019.). Njihova korisnost se očituje obogaćivanjem tla jer se hrane gljivama bogatim

bjelančevinama koje metaboličkim procesima razlažu i vraćaju tlu (Benković-Lačić, 2012.). Također pripadaju sekundarnim razlagačima. Među fungivorama, vrsta *Aphelenchus avenae* jedina se koristi u biološkoj kontroli za suzbijanje gljivičnih patogena (Barnes i sur., 1981.).

2.5.4. Omnivore

Omnivore imaju raznolik izvor prehrane. Mogu se hraniti gljivama, bakterijama, protozoama, rotiferama, tardigradima, drugim nematodama itd. (Brmež i sur., 2019.). Prilično su velike nematode (1-4 mm dužine) i imaju dug životni ciklus. Osjetljive su na uznemirenja tla i pretjeranu implementaciju dušičnih gnojiva, a njihova prisutnost upućuje na stabilan ekosustav.

2.5.5. Predatori

Jedne od najvećih nematoda u tlu, neke vidljive golim okom, čine predatori. Oni se hrane drugim nematodama i organizmima sličnih veličina. U ustima imaju veliku šupljinu u kojoj se nalazi veliki zub i/ili dosta manjih zuba. Neke vrste imaju dvostruka usta: jedna uska prilagođena prehrani bakterijama i šira sa zubima za veći plijen (Kiontke i Fitch, 2013.). Prema načinu ishrane, predatori su podijeljeni u tri skupine: oni koji gutaju cijeli plijen (katkad veće organizme sijeku na dijelove), oni koji probadaju i isisavaju plijen te oni koji sijeku epidermu plijena i usisavaju u sebe njegov sadržaj (Gaugler i Bilgrami, 2004.). Imaju duži životni ciklus i pokazatelji su ekološki čistog i zdravog tla. Vrlo su osjetljivi na uznemirenja tla i u odnosu na ostale nematode, vrlo rijetko ih se u većem broju može pronaći među organizmima u tlu (Brmež i sur., 2019.). Red nematoda kojeg striktno čine predatori zove se *Mononchida*.

2.6. Nematode kao bioindikatori

Za uspješnu poljoprivrednu proizvodnju potrebno je održavati zdravlje i produktivnost tla. Bioraznolikost je vrlo bitna jer smanjuje degradaciju tla, mikrohraniva čini pristupačna biljkama, pozitivno utječe na produktivnost i ukupnu masu biljaka (Brmež, 2019.), no ujedno i pokazatelj onečišćenosti tla. Raznim kontaminacijama tla broj pojedinih organizama

bioindikatora može se drastično smanjiti ili čak potpuno nestati (Raspudić i sur., 2014.). Poznato je kako se nematode koriste kao izvrsni bioindikator unutar različitih ekosustava, budući da su usko povezane s okolinom, široko su rasprostranjene, raznolike, brojne i brzo reagiraju na novonastale promjene u tlu (Brmež i sur., 1999.; Ivezić i sur., 2000., Brmež, 2004.) zbog propustljive kutikule koja iz vode na sebe apsorbira otopljene tvari (Neher i sur., 2005.). Ujedno ih je vrlo lako uzorkovati te identificirati. Stoga je fauna nematoda izvrstan pokazatelj razine onečišćenja tla (pesticidima, teškim metalima, mineralnim gnojivima itd.), količine organske tvari u tlu i cjelokupne biogenosti i zdravlja tla (Bongers i Ferris, 1999.). Nematode se koriste kao bioindikator u procjenama kakvoće vode i tla još od 70-ih godina 20. stoljeća (Zullini, 1976.), a ostale su u toj ulozi sve do danas. Sve trofičke skupine od velikog su značaja za stabilnost i funkcionalnost biologije tla, stoga je bitno promatrati strukturu zajednica nematoda kako bi dobili uvid u stanje tla (Ritz i Trudgill, 1999.).

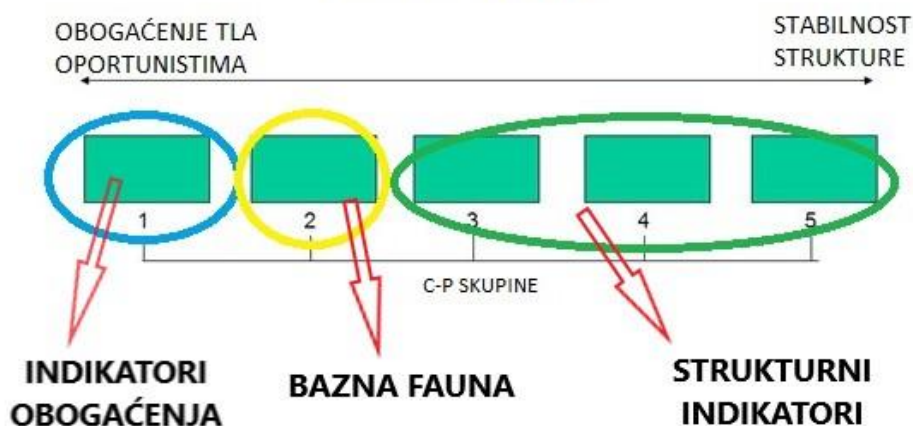
Osim trofičkih skupina, nematode možemo klasificirati i po drugim kriterijima. Dominantnost fitoparazita vodila je ka zaključku da poljoprivredna praksa degradira raznolikost mikrobioma tla, zbog toga se, između ostalog, u drugoj polovici 20. stoljeća javlja potreba za nematološkim indeksima. Njima se nastoji bolje razumjeti povezanost zajednica nematoda i funkcionalnost tla (Brmež i sur., 2019.). U razdoblju od 1999. – 2008. godine, oko 200 radova na međunarodnoj razini temeljilo se upravo na nematološkim indeksima (Ekschmitt i Korthals, 2009.). Na početku razvoja c-p grupa, smatralo se da bi klasifikacija nematoda po spolu ili vrsti bila učinkovitija za svrstavanje u c-p grupe. Međutim, takvo klasificiranje se ispostavilo otežanim zbog nedostatka informacija o biologiji i osjetljivosti pojedinih vrsta. Stoga se utvrdila formalna raspodjela c-p grupa uvođenjem indeksa zrelosti (MI) (Bongers i sur., 1989.; Bongers, 1990.). Dva najčešće korištena indeksa kojima se mjeri uznemirenost nematofaune tla su: indeks zrelosti tla (Maturity index - MI) i biljno-parazitski indeks (Plant parasitic indeks – PPI).

2.7. Indeks zrelosti tla (Maturity index - MI)

Indeks zrelosti tla temelji se na nematodama koje služe razlaganju organskih tvari, tj. isključuje fitoparazitne nematode. Nematode su raspoređene od 1 – 5 na c-p ljestvici (kolonizator-perzister). Kolonizatori na donjem dijelu c-p ljestvice (1-2) smatraju se oportunistima koji ukazuju na dostupna hraniva i brzo se prilagođavaju uvjetima okoline. Perzisteri (4-5) se nalaze pri vrhu ljestvice i upućuju na stabilan ekosustav te kompleksnu

mrežu u hranidbenom lancu (Slika 17). Ostali organizmi (grupa 3) su prijelazni (Brmež i sur., 2019.).

C-P SKUPINE KAO INDIKATORI FUNKCIONIRANJA EKOSUSTAVA



Slika 17. Kalibracija ekosustava c-p grupama
Izvor: <http://nemaplex.ucdavis.edu/>

c-p 1

Ovoj grupi većinski pripadaju bakterivore. Kratkog su životnog ciklusa, ali visoke sposobnosti reprodukcije proizvodeći velik broj malih jajašaca. Mogu imati eksponencijalan rast ukoliko dostupnost hrane poraste. Međutim, u slučaju smanjenja dostupnosti hrane, formiraju trajne ličinke (dauer) kojima preživljavaju nepovoljne uvijete. Tolerantne su na razna onečišćenja (Benković-Lačić i Brmež, 2013.).

c-p 2

Grupi c-p 2 pripadaju nematode kraćeg životnog ciklusa i visoke stope reproduktivnosti, ali ipak nižom od grupe c-p 1. Sporije reagiraju na obogaćenost tla, ali su prisutne u svim sredinama bez obzira na dostupnost hrane. Tolerantne su na onečišćenja tla, ali ne formiraju trajne stadije ličinki. Predstavnici ove skupine su bakterivore i fungivore (Benković-Lačić i Brmež, 2013.).

c-p 3

Nematode ove grupe karakterizira malo duži životni ciklus i manjom tolerantnošću nego prethodna grupa. Njoj pripadaju bakterivore, fungivore i neki predatori (Benković-Lačić i Brmež, 2013.).

c-p 4

Ovoj grupi svojstven je dug životni ciklus, visoka netolerantnost na razna onečišćenja, manja stopa reprodukcije te proizvode mali broj velikih jaja. Pripadaju joj veliki predatori, manje omnivore i velike bakterivore. Omnivore su teže pokretljive, dok predatori vrijedno love svoj plijen (Benković-Lačić i Brmež, 2013.).

c-p 5

Grupu c-p 5 obilježavaju velike nematode, dugog životnog ciklusa. Imaju nisku stopu reprodukcije i proizvode mali broj većih jaja, uz nisku metaboličku aktivnost. Vrlo su osjetljive na uznemirenja i onečišćenje tla. Upućuju na stabilan ekosustav. Ovoj grupi pripadaju velike omnivore i predatori (Benković-Lačić i Brmež, 2013.).

Niske MI vrijednosti aludiraju na veća uznemirenja tla i iznenadnu dostupnost hrane, dok visoke MI vrijednosti govore o stabilnosti biotopa.

Formula za izračun indeksa zrelosti:

$$MI = \frac{\sum[v(i) * f(i)]}{\sum f(i)}$$

v(i)= vrijednost c-p ljestvice koja pripada rodu (i)

f(i)= frekvencija te grupe u uzorku

n= broj nematoda u uzorku

MI/PPI je omjer indeksa zrelosti i fitoparazitnog indeksa te je za oportuniste manji u stresnim uvjetima nego pri povoljnim. Služi za utvrđivanje prisutnosti hrane u poljoprivrednim staništima (Brmež i sur., 2019.).

Indeks MI 2-5 isti je kao i klasičan MI, ali izostavlja oportuniste grupe c-p 1 jer ponekad izvor onečišćenja može biti izvor hrane organizmima kojima se prehranjuju c-p 1 nematode (Brmež i sur., 2019.).

U stabilnim ekosustavima vrijednosti ne prelaze koeficijent od 0,9, a pri uznemirenjima i više od 1,6 (Bongers i sur., 1997.).

2.8. Indeks biljnih parazita (Plant parasitic indeks – PPI)

Indeks biljnih parazita baziran je isključivo na fitoparazitnim nematodama. U normalnim okolnostima tla, bez uznemiravanja, najviše ima *Tylenchida* (c-p 2), zbog čega je indeks PPI često niži od sustava s većom prisutnosti domaćina (obrnuto od MI). Vrijednosti se kreću od 2-5, gdje je 2 najniži rang fitoparazita. Indeks PPI se izračunava na isti način kao i MI (Brmež i sur., 2019.).

2.9. Indeksi hranidbenog lanca

Indeksi hranidbenog lanca služe kao pregled funkcioniranja hranidbenog lanca, procesa razgradnje hranjiva i o njihovoj raspoloživosti u tlu. Prema Ferris-u i sur. (2004.) dijele se na: EI (indeks obogaćenja), SI (indeks strukture), CI (pokazatelj razgradnje organske tvari), BI (bazalni indeks), ali za naš rad bitni su samo SI i BI.

Indeks strukture (SI) pokazuje složenost trofičkih grupa tla. Što su veće vrijednosti SI, to su poželjnije.

Odnosi se na c-p ljestvicu (3-5), a računa se prema formuli (Ferris i sur., 2004.):

$$SI=100*s/(s+b),$$

s – grupa nematoda svih trofičkih skupina 3-5

b – nematode svih trofičkih skupina klasificirane kao c-p2.

Bazalni indeks (BI) ukazuje na smanjenje populacije nematoda uzrokovane stresom i ubraja sve nematode viših c-p skupina (3-5). Poželjnije su niže vrijednosti. Računa se po formuli (Ferris i sur., 2004.): $BI=100*b/(e+s+b)$, varijabla **e** označava koeficijent obogaćivanja (bakterivore c-p1 i fungivore c-p2).

3. MATERIJALI I METODE

Pokus je postavljen 2021. godine, na imanju Tomislav Pasariček, Škrinjari 26, na granici Koprivničko-križevačke i Zagrebačke županije, na površinama pod pšenicom. Predkultura je kukuruz. Sorta pšenice bila je RWA Sofru, a sjetvena norma 240 kg/ha. Ukupna površina pokusnog polja iznosila je 1,43 ha.

Pokus je postavljen u četiri tretmana:

1. TRETMAN:

Kontrola (pšenica bez tretiranja)

2. TRETMAN:

Osnovna gnojidba – pšenica tretirana s **Ekovitalom** (2l/ha)

Sjeme tretirano s **Ekobusterom 1**

Prva prihrana – **Ekobuster 2** (1l/ha)

Druga prihrana – **Ekobuster 2** (1l/ha)

Treća prihrana – **Ekobuster max** (1l/ha)

Mineralna gnojiva nisu primijenjena

3. TRETMAN:

Osnovna gnojidba 350kg/ha **NPK** u omjeru 0:20:30 te **Urea** u količini 150kg/ha

Sjeme tretirano s **Ekobusterom 1**

Prva prihrana – **KAN** 200kg/ha

Druga prihrana – **KAN** 200kg/ha

4. TRETMAN:

Osnovna gnojidba 350kg/ha **NPK** u omjeru 0:20:30 te **Urea** u količini 150kg/ha

Sjeme tretirano s **Ekobusterom 1**

Prva prihrana – **Ekobuster 2** (1l/ha)

Druga prihrana – **Ekobuster 2** (1l/ha)

Treća prihrana – **Ekobuster max** (1l/ha)

Tlo je uzorkovano u dva navrata i to: 15. 04. 2021. i 13. 07. 2021. kako bi se utvrdio utjecaj navedenih pripravaka na bioraznolikost zajednice nematoda u tlu kao bioindikatora kvalitete tla. Ekobuster je organsko, folijarno gnojivo i biostimulator, koji jača imunitet biljaka te stimulira njihov rast i razvoj, a primjenjuje se u svim ratarskim, povrćarskim i voćarskim kulturama. Ekovital je organski preparat, ekološko gnojivo i biostimulator, koji služi kao aktivator razvoja bakterija u tlu i time utječe na povećanje razine humusa u tlu.

Tlo je uzorkovano na dubini od 0 do 25 cm, sondom promjera 2 cm u 4 ponavljanja za svaku varijantu. Označeno je i spremljeno u plastične vrećice te dopremljeno na Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek na analizu. Izdvajanje nematoda iz tla, te prebrojavanje i determinacija obavljene su na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek, na Zavodu za fitomedicinu.

Nematode su izdvojene iz tla Baermanovom metodom lijevaka (Baerman, 1917.) prikazanoj na Slici 18. Determinacija do roda je obavljena po sljedećim ključevima: Andrassy (1984., 1988., 1993.), Bongers (1994.), Hunt (1993.), Mai i Lyon (1975.).



Slika 18. Baermanova metoda izdvajanja nematoda iz tla pomoću lijevaka
Izvor: Autorica, Gloria Ninković

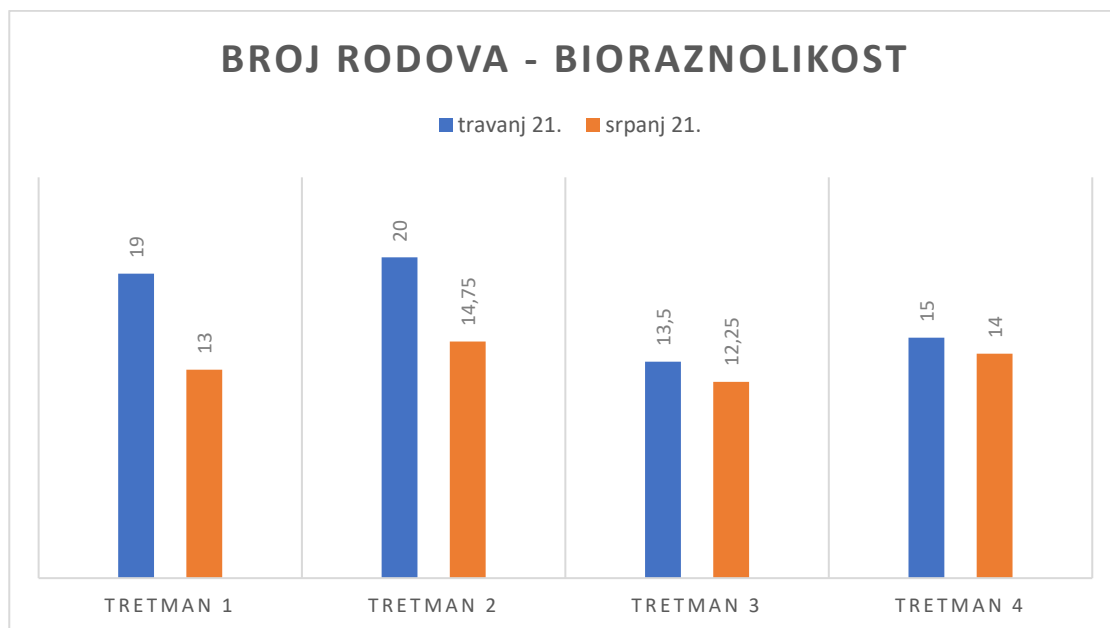
U pokusu je analizirana ukupna brojnost nematoda, broj rodova, struktura rodova, indeksi uznemirenja (MI, MI (2-5), PPI, PPI/MI, BI i SI). Budući da je pokus obavljen u 4 ponavljanja, nakon izračunavanja navedenih parametara, provedena je statistička analiza: analiza varijance i Lsd test (SAS 9.4. Software, 2017.).

4. REZULTATI

3.1. Broj rodova nematoda i ukupnu brojnost nematoda

Prosječan (od 4 ponavljanja) broj rodova nematoda po tretmanima prikazan je u Grafikonu 1.

Broj rodova nematoda po tretmanima



Grafikon 1. Broj rodova nematoda po tretmanima

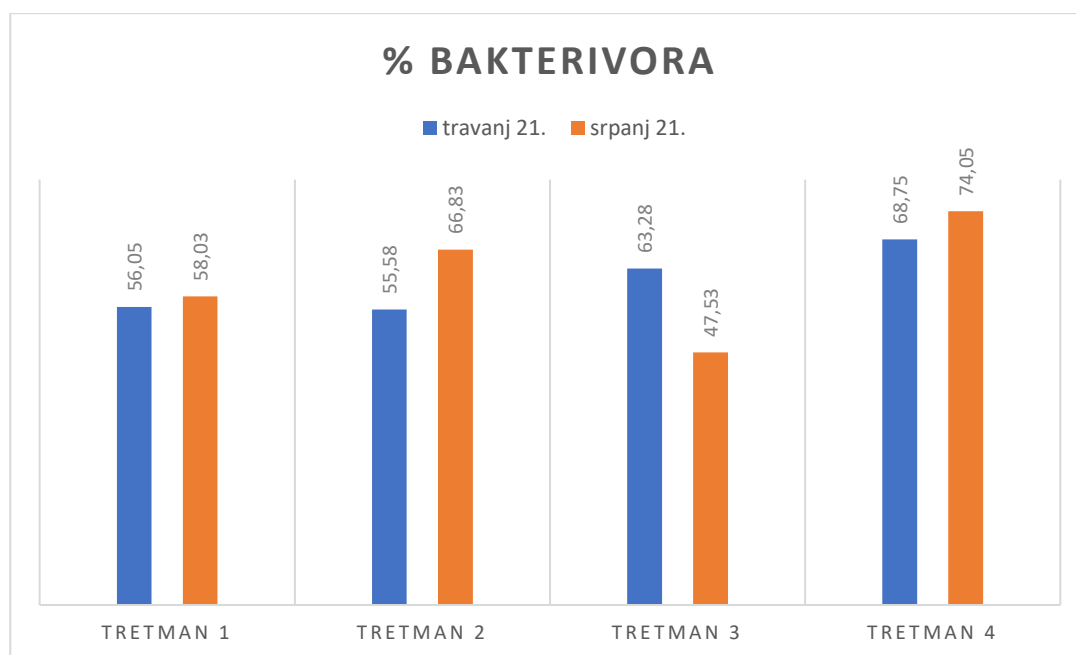
Kako je vidljivo u grafikonu, najveći broj rodova zabilježen je u tretmanu 2, a najmanji u tretmanu 3. Općenito, veći broj rodova u svim tretmanima bio je u travnju nego u srpnju, kada zbog vrućina naglo opada brojnost nematoda u tlima. I u travnju i u srpnju najveća bioraznolikost zabilježena je u tretmanu 2, dok je statistički značajno veća bioraznolikost utvrđena u travnju u tretmanu 1 (kontrola) i 2 (Ekovital i Ekobuster) u odnosu na tretmane 3 i 4 (tretmani u kojima ima umjetnih gnojiva).

Ukupna brojnost nematoda u 100 g tla kretala se od 422 do 474 nematode te u ukupnoj brojnosti nisu zabilježene statistički značajne razlike između tretmana, već su statistički značajne razlike utvrđene između vremena uzorkovanja. U travnju 2021. zabilježeno je prosječno 537 nematoda u 100 g tla, dok je u srpnju zabilježeno statistički značajno manje nematoda, samo 352. To je bilo i za očekivati budući da je u srpnju u tlu puno manje vlage, a poznato je da nematode žive u filmu vode oko čestice tla, stoga je brojnost pala u svim tretmanima podjednako.

4.2. Rezultati analize trofičkih grupa nematoda

Trofičke grupe nematoda predstavljaju grupe ishrane. Zdravo i dobro strukturirano tlo ima veći udio omnivora i predatora, dok udio bakterivora i fungivora ukazuje na putove razgradnje organske tvari u tlu. Veći broj fungivora ukazuje na povećanu količinu gljiva u tlu koja je često povezana s povećanjem kiselosti tla. Fitoparazitske nematode nisu poželjne u velikom broju, međutim, one mogu biti enktoparaziti (napadaju biljku izvana) ili endoparaziti (ulaze cijele u biljku i tamo žive), a u ovom istraživanju nije rađena analiza biljnog materijala kako bi se utvrdila brojnost endoparazita u biljci. One u principu ne prave velike probleme u pšenici, a prisutne su svugdje gdje je velik broj korjenčića i biljnog materijala. Što je veći broj korjenčića u tlu to je veći broj fitoparazita i vrlo često je njihova brojnost visoka i na travnjacima i pašnjacima što ne znači nužno osiromašen ekosustav. Najpouzdaniji parametar za očitavanje zdravlja tla putem trofičkih grupa su omnivore i predatori koji, ukoliko su prisutni, ukazuju na „zdravo tlo“. U sljedećih pet grafikona (Grafikon 2 do 6) prikazane su trofičke grupe po tretmanima i vremenima uzorkovanja.

Udio bakterivora u zajednici nematoda

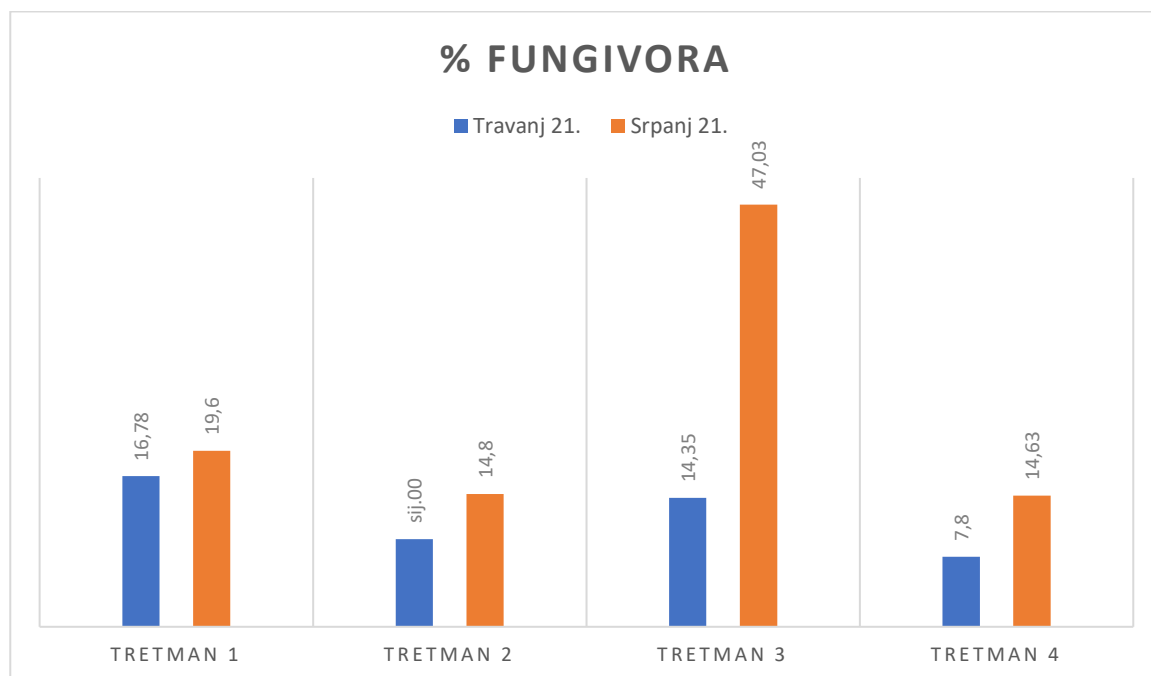


Grafikon 2. Udio bakterivora po tretmanima

Najveći postotak nematoda iz grupe bakterivora utvrđen je u tretmanima 2 i 4 tj. u tretmanima u kojima su primijenjeni preparati Ekobuster i Ekovital (Grafikon 2). Najmanja brojnost bakterivora utvrđena je u srpnju 2021. u tretmanu 3, u tretmanu s umjetnim

gnojivima. Veća brojnost bakterivora ukazuje na pojačanu bakterijsku aktivnost i brže puteve razgradnje organske tvari.

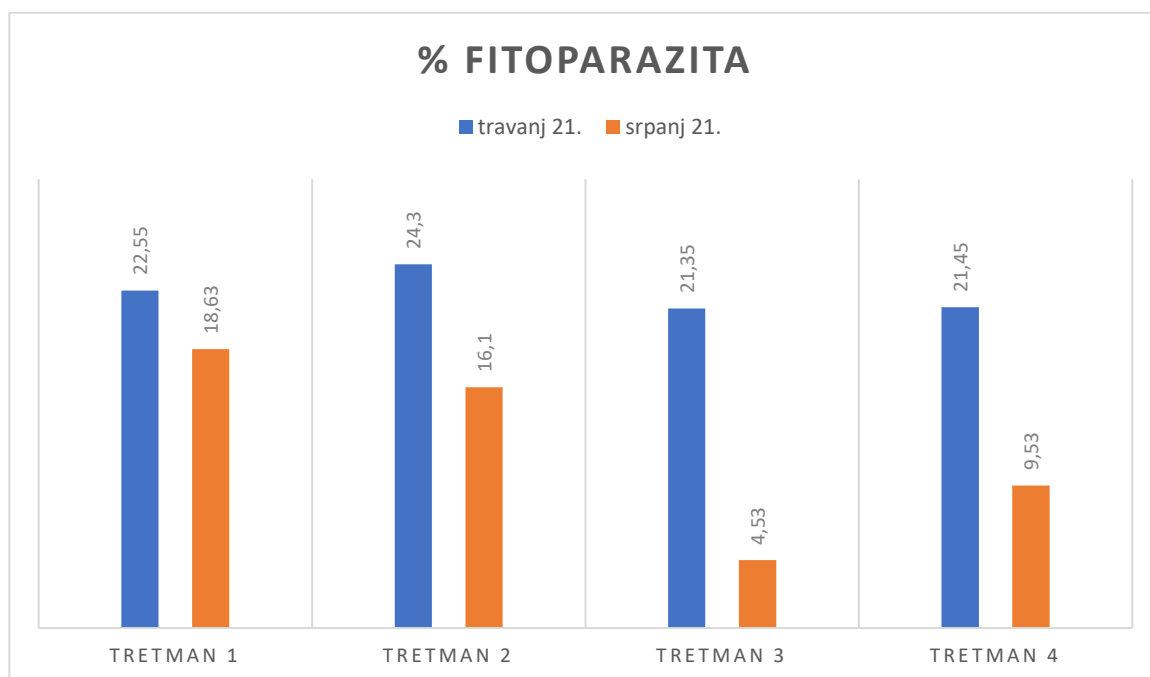
Udio fungivora u zajednici nematoda



Grafikon 3. Udio fungivora po tretmanima

Najveći postotak nematoda (statistički vrlo značajan) iz grupe fungivora utvrđen je u tretmanu 3 (tretman s mineralnim gnojivima) i to u srpnju, što nije poželjno, jer je to znak da je tlo zakiseljeno i da nema dovoljno bakterijske aktivnosti (Grafikon 3). Ostali tretmani (1,2 i 4) imaju poželjnije vrijednosti, s tim da tretmani 2 i 4 imaju manje fungivora od kontrole, iako između njih i kontrolnog tretmana nema statistički značajnih razlika.

Udio fitoparazita u zajednici nematoda

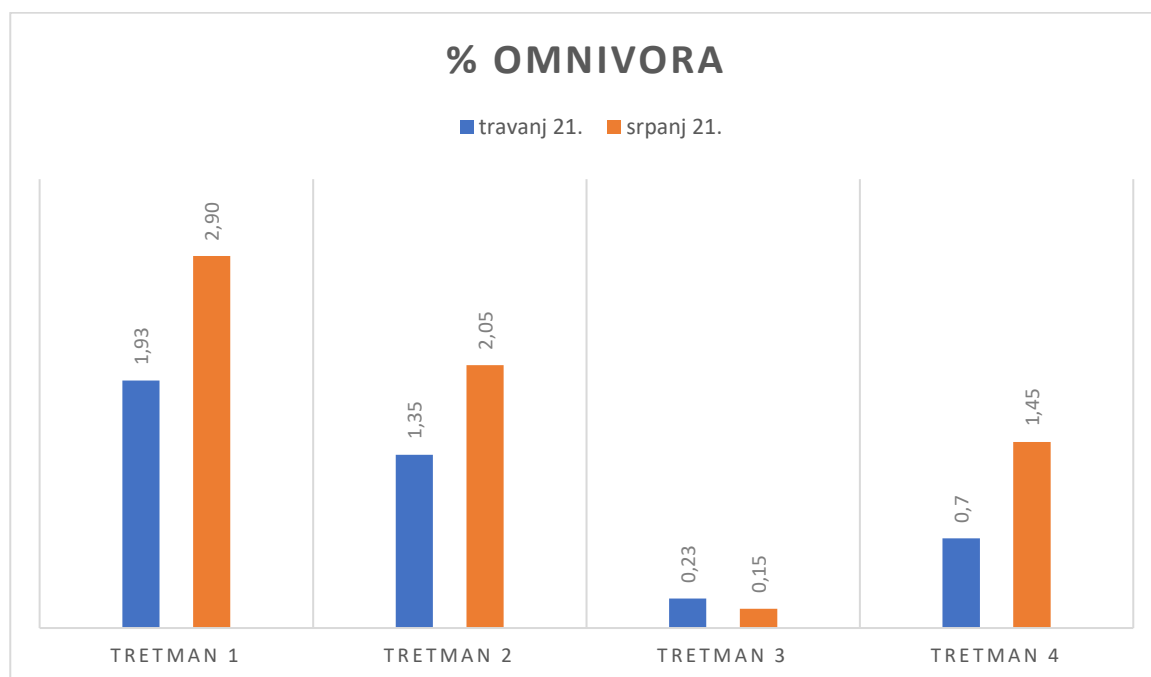


Grafikon 4. Udio fitoparazita po tretmanima

Brojnost fitoparazitnih nematoda u svim tretmanima bila je statistički značajno veća u travnju u odnosu na srpanj (Grafikon 4). Najmanji broj fitoparazitnih nematoda zabilježen je u tretmanu 3, u srpnju 2021. godine, te se taj tretman statistički značajno razlikovao od svih tretmana osim tretmana 4 u srpnju 2021.

Veća brojnost fitoparazita usko je povezana i s većim i s razgranatijim korijenjem.

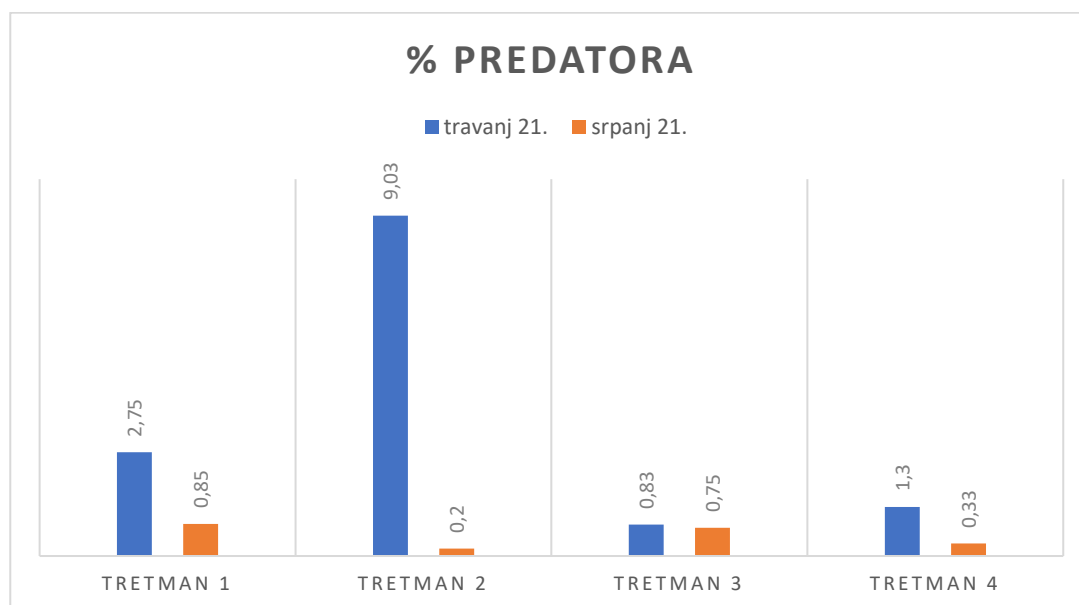
Udio omnivora u zajednici nematoda



Grafikon 5. Udio omnivora po tretmanima

Nematode iz grupe omnivora su poželjne u zdravim tlima, a u ovom istraživanju bile su brojnije u srpnju u odnosu na travanj 2021. godine (Grafikon 5). Omnivore imaju dugi životni ciklus i potrebno je nekoliko mjeseci da od ličinke narastu u odrasle jedinke. U tom vremenu ne bi trebalo biti uznemirenja u tlu kako bi one mogle završiti svoj životni ciklus. U ovome slučaju statistički najmanji broj omnivora zabilježen je u tretmanu 3 (tretman s mineralnim gnojivom), a najveći u kontrolnom tretmanu (Grafikon 5). Iako je kontrolni tretman imao najveći broj omnivora, nisu zabilježene statistički značajne razlike između njega (tretmana 1) i tretmana 2 i 4 (tretmani s Ekobusterom i Ekovitalom).

Udio predatora u zajednici nematoda



Grafikon 6. Udio predatora po tretmanima

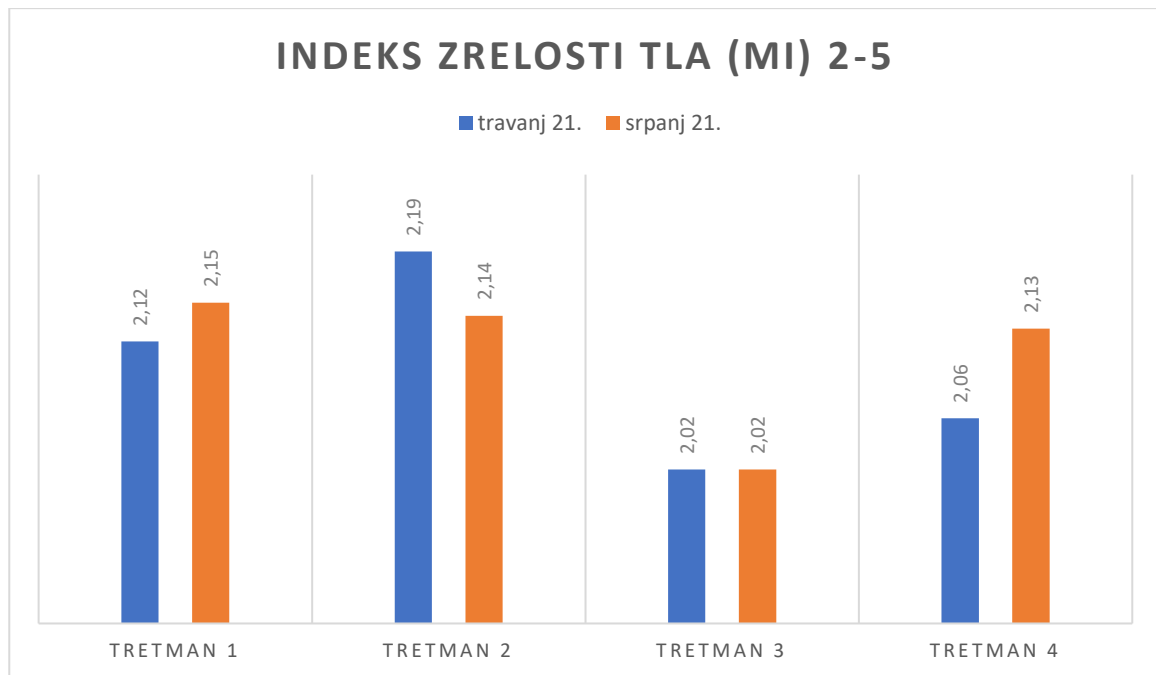
Predatori čine grupu nematoda koja se hrani drugim organizmima i pripada velikim nematodama, prisutni su u oraničnim tlima uvijek u nešto nižem postotnom udjelu od ostalih trofičkih grupa. Predatori ukazuju na stabilan ekosustav. U ovom istraživanju statistički najveća brojnost predatora utvrđena je u travnju 2021. u tretmanu 2, zatim u kontroli u travnju 2021. godine, a najmanju brojnost imali su tretmani 3 i 4, tj. tretmani s mineralnim gnojivima (Grafikon 6). Po vremenu uzorkovanja, veća brojnost je utvrđena u travnju u odnosu na srpanj, kao i ukupna brojnost nematoda u tlu.

4.3. Rezultati nematoloških indeksa

Nematološki indeksi predstavljaju kvantitativna mjerenja strukture zajednice nematoda koji pobliže označavaju kvalitetu same zajednice nematoda, a time i kvalitetu tla.

Indeks zrelosti tla (MI 2-5)

Najčešće korišteni su Indeks zrelosti tla, gdje veće vrijednosti predstavljaju bolje tlo. Ako je u tlu puno nematoda s kratkim životnim ciklusom i tolerantnih za onečišćenja, indeks MI 2-5 je manji, a ako ima puno nematoda dugog životnog ciklusa koje su osjetljive na uznemirenja i nečistoće indeks MI 2-5 je veći.

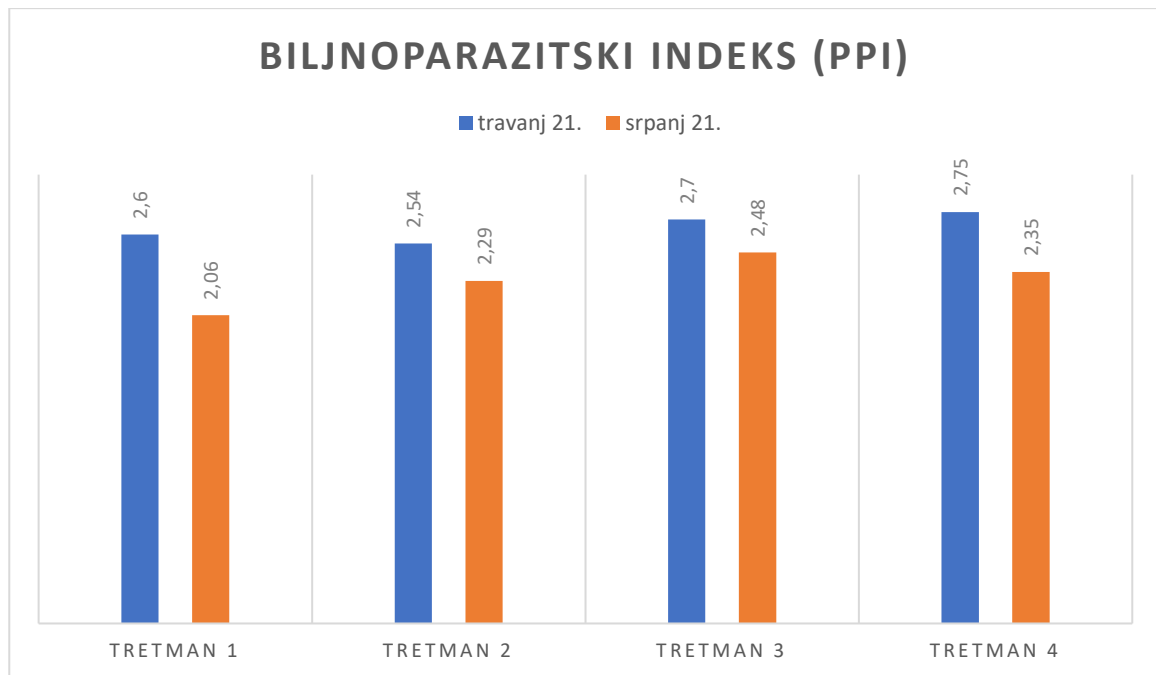


Grafikon 7. Vrijednosti indeksa zrelosti tla (MI) 2-5 po tretmanima

Najbolje vrijednosti indeksa MI 2-5 utvrđene su u tretmanu 2 s preparatima Ekobuster i Ekovital (Grafikon 7), dok su najniže vrijednosti utvrđene u tretmanu 3 s mineralnim gnojivima.

Biljno-parazitni indeks (PPI)

Biljno-parazitni indeks (PPI), za razliku od indeksa MI 2-5, predstavlja vrijednost fitoparazitnih nematoda. Poželjno je da vrijednost PPI indeksa bude što niža, jer su i štete koje fitoparazitne nematode pri tom manje.

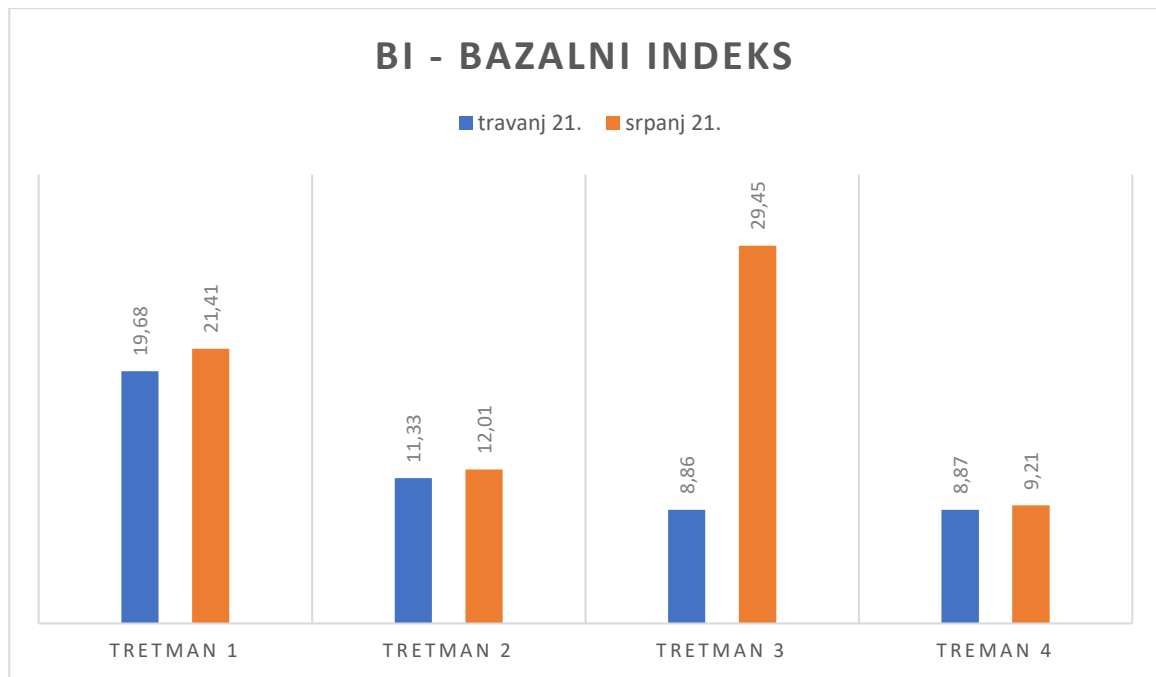


Grafikon 8. Vrijednosti biljnoparazitnog indeksa (PPI) po tretmanima

U ovome istraživanju utvrđene su najveće vrijednosti indeksa PPI u tretmanima s dodatkom mineralnih gnojiva, tj. u tretmanima 3 i 4 (Grafikon 8), dok su najmanje vrijednosti utvrđene u kontroli i tretmanu 2 (s Ekobusterom i Ekovitalom). U Grafikonu 4 koji je pokazivao udio fitoparazita, najmanja brojnost je bila u tretmanu 3, tj. u tretmanu s mineralnim gnojivima, ali upravo indeks PPI prikazuje da su ti fitoparaziti bili puno štetniji i opasniji od onih u drugim tretmanima, jer je vrijednost PPI najveća, što znači da u tom tretmanu fitoparazitne nematode, iako u maloj brojnosti, imaju najduži životni ciklus, najveće su veličinom i imaju najveće stilete i prave najveće štete (jer imaju najveće c-p vrijednosti).

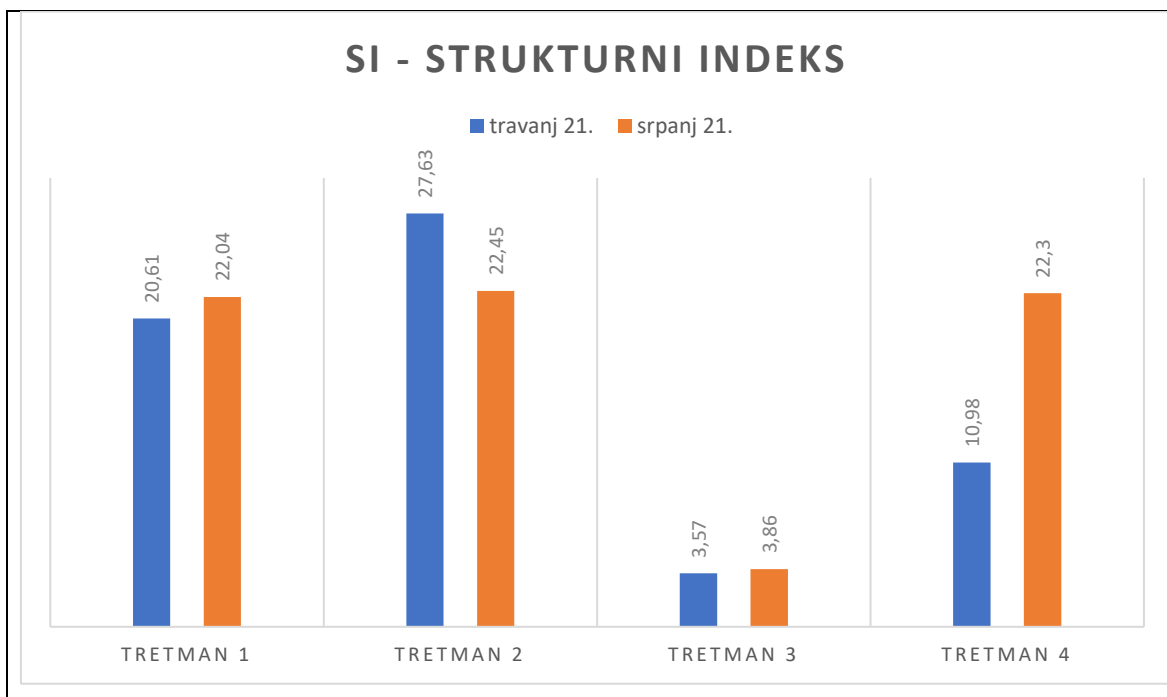
Bazalni indeks (BI) i Strukturni indeks (SI)

Od ostalih nematoloških indeksa, najznačajniji su Bazalni indeks (BI) gdje su niže vrijednosti bolje te Strukturni indeks (SI) gdje više vrijednosti ukazuju na bolje strukturirano i kvalitetnije tlo. U nastavku sljedeća dva grafikona (Grafikon 9 i Grafikon 10) prikazuju vrijednosti navedenih indeksa.



Grafikon 9. Vrijednosti baznih indeksa (BI) po tretmanima

Najbolje vrijednosti indeksa BI utvrđene su u tretmanima 2 i 4, tj. u tretmanima u kojima je dodan preparat Ekobuster i Ekovital, dok su statistički značajno najlošije vrijednosti utvrđene u tretmanu 3, s mineralnom gnojibom (Grafikon 9).



Grafikon 10. Vrijednosti strukturalnih indeksa (SI) po tretmanima

Najbolje strukturirano tlo, tj. najviše i najbolje vrijednosti indeksa SI utvrđene su u tretmanu 2, a najlošije u tretmanu 3, tj. tretmanu s mineralnom gnojdbom i to sa statistički značajnim razlikama (Grafikon 10).

5. RASPRAVA

Analiza utjecaja biostimulatora i mineralne gnojidbe na bioraznolikost i strukturu zajednica nematoda u tlu kao najboljih bioindikatora kvalitete tla provedena je u dva navrata na usjevu pšenice kroz tretmane biostimulatorima (Ekobooster i Ekovital), mineralnim gnojivima, kombiniranim tretmanom i kontrolnom tretmanu. Ukupna bioraznolikost rodova nematoda bila je veća u travnju nego u srpnju, budući da je ljeti vlaga u tlu puno manja. To mogu potvrditi i rezultati istraživanja kojeg su proveli Brmež i sur. (2004.), gdje se ukupna brojnost nematoda i rodova povećavala razvojem vegetacije pšenice, a krajem vegetacije broj se smanjio. Prema navedenim autorima, ukupan broj nematoda bio je najmanji u listopadu, a najveći u travnju, dok je najmanji broja rodova utvrđen u listopadu, a najveći u ožujku.

Bioraznolikost nematoda razlikovala se u tretmanima vidljivim na Grafikonu 1. Najveća bioraznolikost zajednica nematoda utvrđena je u tretmanu 2 s preparatima Ekobuster i Ekovital, čak više od kontrolnog tretmana, čime se može zaključiti da je došlo do obogaćenja tla. Prema Tejada i sur. (2011.) primjena biostimulatora s većim količinama proteina, u semiaridnim klimatskim uvjetima, također značajno utječe na povećanje mikrobiološke aktivnosti tla jer mogu lakše apsorbirati protein. Slične rezultate imali su Van Diepeningen i sur. (2006.) u organskom uzgoju gdje su zaključili da veća raznolikost rodova nematoda pruža bolju mogućnost za obnovu tla od konvencionalnog uzgoja, kao i Gomez i sur. (2006.) kojima je veća bioraznolikost bila utvrđena u tretmanu organskim dodatcima (vermikompost i pileći gnoj) u odnosu na kontrolu.

Nematode su klasificirane u pet trofičkih skupina – bakterivore, fungivore, fitoparaziti, omnivore i predatori. Bakterivora je bilo najviše u tretmanima s dodatkom Ekobustera i Ekovitala, a najmanje u tretmanu s mineralnim gnojivima, što ukazuje na pojačanu bakterijsku aktivnost pri tretiranju biostimulatorima, a time i mikrobiološku razgradnju. Prema višegodišnjem istraživanju Kineskog poljoprivrednog sveučilišta (Hu i Qi, 2010.) na usjevu kukuruza veća gustoća bakterivora utvrđena je u tlu tretiranom kompostom nego u tretmanu kemijskim gnojivima.

Najveći udio fungivora zabilježen je u tretmanu s mineralnim gnojivima u srpnju, koji se značajno razlikovao od ostalih tretmana. Takav ishod upućuje na veliku prisutnost gljivica u tlu, a time zakiseljenost tla, čime se bakterijska aktivnost snižava. Veću populaciju fungivora pri dodavanju umjetnih gnojiva u svojim istraživanjima su imali Benković-Lacić i sur. (2013.), a tako i Bulluck i sur. (2002.).

Broj fitoparazitnih nematoda u tretmanu 3, s mineralnim gnojivima, statistički se značajno razlikovao od tretmana 2 s biostimulatorima. Najmanji udio zabilježen je u tretmanu 3, dok je najveći udio fitoparazita utvrđen u tretmanu 2. Benković-Lacić i sur. (2013.) su također dobili slične podatke kojim potvrđuju povećanu prisutnost fitoparazitnih nematoda u tlu koje je prihranjeno organskim gnojem uspoređujući ga s kontrolnom parcelom. Rezultati Neher (1999.) podudaraju se s našim rezultatima. Međutim, neki autori tvrde da se broj fitoparazitnih nematoda smanjio nakon tretiranja s organskim stajnjacima (Clark i sur., 1998.).

Postotak omnivora najmanji je bio u tretmanu s mineralnom gnojidbom, a najveći u kontrolnom tretmanu, no tretman s prihranom biostimulatorima nije se značajno razlikovao od tretmana kontrole. Postotak predatora statistički se vrlo značajno istakao u tretmanu biostimulatorima gdje ih je zabilježeno najviše, u odnosu na ostale tretmane, zbog čega se tretman 2, tj. dodavanje biostimulatora, ispostavilo kao solucija za popravak i stabilizaciju tla.

Indeks zrelosti tla (MI 2-5) bio je najniži u tretmanu s umjetnim gnojivima, a najviši indeks imao je tretman s Ekobuster i Ekovital pripravcima, što znači da je parcela pod tretmanom biostimulatora imala najstabilnije i najkvalitetnije tlo. Zhang i sur. (2009.) je u svom istraživanju utvrdio nižu razinu MI pri dodatku umjetnih gnojiva i objasnio je kao nepovoljne uvjete sredine. Dok Hu i Qi (2010.) navode rezultate niže u tretmanu s organskim gnojivom naspram tretmana mineralnim gnojivima i kontrolom.

Biljnoparazitski indeks (PPI) bio je najlošiji u tretmanima 3 i 4 (s dodatkom mineralnih gnojiva) i statistički značajnije se razlikovao od tretmana s biostimulatorima i kontrolom. Rezultati Hu i Qi (2010.) govore suprotno, jer je njihov PPI bio viši u tlu tretiranom kompostom u usporedbi s tlom tretiranim mineralnim gnojivima.

Dobiveni rezultati ukazuju da inkorporiranje biostimulatora u način gnojidbe, poboljšava strukturu zajednice nematoda u tlu, kao i samu kvalitetu tla. Isto potvrđuju Wu i sur. (2023.).

6. ZAKLJUČAK

Nakon provedenih analiza utjecaja preparata Ekobuster i Ekovital te primjene mineralne gnojidbe u pšenici, u pokusu provedenom na pšenici tijekom 2021. godine možemo donijeti sljedeće zaključke:

-od svih ispitivanih tretmana, tretman u kojem su korišteni preparati Ekobuster i Ekovital, tj. tretman br. 2 bio je najbolji u bioraznolikosti rodova (čak i u odnosu na kontrolu – što znači da je obogatio tlo)

- trofička struktura koja ukazuje na kvalitetu tla (udio omnivora i predatora) bila je najbolja u tretmanu br. 2.

- Indeks zrelosti tla (MI 2-5) bio je najbolji u tretmanu br. 2, dok su vrijednosti biljnoparazitskog indeksa (PPI) bile najbolje u kontroliranom tretmanu i tretmanu br. 2, a najlošije u tretmanu s mineralnim gnojivima (tretman 3 i 4).

-Bazalni indeks (BI) bio je najbolji u tretmanu 2 i 4, tj. tretmanima gdje je korišten Ekobuster i Ekovital, a najlošiji u tretmanu s mineralnom gnojibom

- Strukturni indeks (SI) bio je najbolji u tretmanu 2, s Ekobusterom i Ekovitalom, a statistički značajno najlošiji u tretmanu s mineralnom gnojibom.

Tretmani u kojemu su korišteni preparati Ekobuster i Ekovital podigli su bioraznolikost rodova i poboljšali strukturu tla, dok je tretman s mineralnom gnojibom smanjio bioraznolikost u tlu i narušio strukturu i zdravlje tla.

7. POPIS LITERATURE

1. Anderson, R.C. (2000.): Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission. 2nd ed. Oxford, UK: CABI Publishing; p. 650.
2. Andrassy, J. (1984.): Klasse nematoda. Gustav Fisher Verlag. Stuttgart, pp. 509.
3. Andrassy, J. (1988.): The superfamily Dorylamoidea (Nematoda) – review of Family Dorylaimidae. Opus. Zoologica Budapest, 23: 3 – 63
4. Andrassy, J. (1993.): A taxonomic survey of Family Mononchidae (Nematoda). Acta Zoologica Hungarica, 39: 13 – 60.
5. Ax, P. (2003.): Multicellular Animals: Order in Nature - System Made by Man, Volumes I-III. Springer- Verlag. Heidelberg. Berlin.
6. Baermann, G. (1917.): Eine einfache Methode zur Auffindung von *Ankylostomum* (Nematoden) larven in Erdproben. Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch Indië 57, 131-137.
7. Barnes, R.G. (1980.): Invertebrate zoology. Philadelphia: Sanders College.
8. Barnes, G.L., Russel, C.C., Foster, W.D., McNew, R.W. (1981.): *Aphelenchus avenae*, a potential biological control for root rot fungi. Plant Diseases, 65:423-424.
9. Bell, G. (1982.): The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality. Berkeley: University of California Press
10. Benković-Lačić, T. (2012.): Nematode kao bioindikatori ekološkog stanja tla. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet u Osijeku. pp. 126.
11. Benković-Lačić, T., Brmež, M. (2013.): Nematode – bioindikatori promjena u agroekosustavu. Agronomski glasnik. 1/2013: 43-5.
12. Benković-Lačić, T., Brmež, M., Ivezić, M., Raspudić, E., Pribetić, D., Lončarić, Z., Grubišić, D. (2013.): Influence of organic and inorganic fertilizers on nematode communities in cornfield, Bulgarian Journal of Agricultural Science, Agricultural Academy, 19 (No 2) 2013, 235-240
13. Bongers, T., Goede, R.G.M., de Kappers, F.I., Manger, R. (1989.): Ecologische typologie van de Nederlandse bodem op basis van de vrijlevende nematodenfauna. *RIVM-rapport 718602002*.
14. Bongers, T. (1990.): The maturity indeks; an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition, *Oecologia* 83:14-19
15. Bongers, T. (1994.): De nematoden van Nederland. KNNV: Utrecht. pp.408

16. Bongers, T., Meulen, H., Korthals, G.V. (1997.): Inverse relationship between the nematode maturity index and plant parasite index under enriched nutrient conditions. *Applied Soil Ecology* 6 (2): 195 – 199
17. Bongers, T., Ferris, H. (1999.): Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Trends in Ecology and Evolution*, 14, 224-228.
18. Brmež, M. (1999.): Nematode kao bioindikator stanja agroekosustava. Magistarski rad, pp. 61.
19. Brmež, M. (2004.): Zajednica nematoda kao bioindikator promjena u agroekosustavu. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek
20. Brmež, M., Ivezić, M., Raspudić, E., Majić, I. (2004.): Dinamika populacije nematoda u pšenici. *Agriculture* 10(2):5-9.
21. Brmež, M., Ćosić, J., Raspudić, E., Baličević, R., Liška, A., Majić, I., Ilić, J., Sarajlić, A., Lucić, P., Ravlić, M., Puškarić, J. (2019.): Okolišno prihvatljiva zaštita bilja, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, str. 39 – 53.
22. Bulluck, L. R., Barker, K. R., Ristaino, J. B. (2002.): Influence of organic and synthetic soil fertility amendments on nematode trophic groups and community dynamics under tomatoes. *Applied Soil Ecology*, 21: 233-250.
23. Chitwood, D.J. (2003.): Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. *Pest Manag.*, 59, 748–753.
24. Clark, M. S., Ferris, H., Klonsky, K., Lanini, W. T., Van Bruggen A. H. C., Zalom, F. G. (1998.): Agronomic, economic and environmental comparison of pest management in conventional and alternative tomato and corn systems in northern California. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 68: 51-71.
25. Corbett, D.C.M., Clark, S.A. (1983.): Surface characters in the taxonomy of *Pratylenchus* species. *Revue de Nématologie* 6: 85-98.
26. Ekschmitt, K., Bakonyi, G., Bongers, M., Bongers, T., Boström, S., Dogan, H., Harrison, A., Kallimanis, A., Nagy, P., O'Donnell, A., Sohlenius, B., Stamou, G., Wolters, V. (1999.): Effects of the nematofauna on microbial energy and matter transformation rates in European grassland soils. *Plant and Soil*. 212. 45-61.
27. Ekschmitt, K., Korthals, G. (2009.): Molecular Markers, Indicator Taxa, and Community Indices: the Issue of Bioindication Accuracy, in *Nematodes as environmental indicators*, MPG Books Group, UK, pp 341

28. Ferris, H., Bongers, T., De Goede, R. (2004.): Nematode faunal analyses to assess food web enrichment and connectence. *Nematology Monographs & Perspectives* 2:503-510
29. Freckman, D. W., Cawell, E. P. (1985.): The ecology of nematodes in agroecosystem. *Ann. Rev. Phytopatol.* 23: 275-96.
30. Gomez, E., Ferreras, L., Toresani, S. (2006.): Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application, *Bioresource Technology*, 97(13), 1484-1489.
31. Gubanov, N. M. (1951.): Гигантская нематода из плаценты китообразных - *Placentonema gigantissima* nov. gen., nov. sp. [A giant nematode from the placenta of Cetacea ...], *Doklady Akademii Nauk SSSR* 77, No. 6, pp. 1123-1125 : 1123
32. Gaugler, R., Bilgrami, A. (2004.): Gaugler, R. & A. Bilgrami (Eds). 2004. "Nematode Behavior" CABI Publ. 419 pp.
33. Hu, C., Qi, Y. (2010.): Effect of compost and chemical fertilizer on soil nematode community in a Chinese maize field, *European Journal of Soil Biology*, Volume 46, Issues 3–4, 230-236
34. Huang Y., Guo Y., (2021.): *Free-living Marine Nematodes from the East China Sea*, Springer Nature,
35. Hugot P, Banjard P, Morano S.(2001.): Biodiversity in helminthes as a field of study: An overview. *Nematology.* 3:199-208
36. Hunt, D. J. (1993.): *Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae – Their systematics and bionomics.* CAB INT. Wallingford, UK. pp. 352.
37. Hunt, D.J., Luc, M., Manzanilla Lopez, R. H. (2005.): Identification, morphology and biology of plant parasitic nematodes. 11-52.
38. Ishibashi, N., Kondo, E., Kashio, T. (1975.): The induced molting of 4th-Stage larvae of pin nematode, *Paratylenchus aciculus* Brown (Nematoda: Paratylenchidae), by root exudate of host plant: ecological significance of dormancy in plant parasitic nematodes. III. *Applied Entomology and Zoology*, 10(4): 275-283.
39. Ivezić, M., Šamota, D., Raspudić, E. (1990.): Utjecaj povišenih doza kalija na fitoparazitne nematode kukuruza. *Glasnik zaštite bilja*, 9-10:352.-353.
40. Ivezić, M., Raspudić, E., Brmež, M. (2000.): Structure of nematode communities in different agroecosystems in Croatia. *Helminthologia*, 37(3):165-169.
41. Ivezić M. (2014.): *Fitonematologija*, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 109.

42. Johnigk S.A., Ehlers R.U. (1999.): *Endotokia matricida* in hermaphrodites of *Heterorhabditis* spp. and the effect of the food supply. *Nematology*. 1 (7–8): 717–726.
43. Kiontke, K., Fitch, D. H.A. (2013.): Nematodes, *Current Biology*, Volume 23, Issue 19, str. R862-R864
44. Lamshead, P. J. D. (1993.): Recent developments in marine benthic biodiversity research, *Oceanis*, 19:5-24
45. Lamshead, P. J. D., Boucher, G. (2003.): Guest Editorial: Marine Nematode Deep-Sea Biodiversity, Hyperdiverse or Hype, *Journal of Biogeography*, 30(4), 475–485.
46. Mai, W.F., Lyon, H.H. (1975.): Pictorial key to genera of plant-parasitic nematodes. Cornell University Press. London. pp. 219
47. Majić I., Raspudić E., Nježić B., Kanižai Šarić G., Sarajlić A. (2017.): Važnost plodoređa i bionematocida u suzbijanju *Meloidogyne* hapla i *Paratylenchus bukowinensis* u mrkvi i peršinu, *Glasilo biljne zaštite* 4/2017
48. McSorley, R. (1997.): *Soil Inhabiting Nematodes*, Phylum Nematoda. University of Florida. Institute of Food and Agriculture Sciences.
49. McSorley, R. (2003.): Adaptions of Nematodes to Environmental Extremes. *Florida Entomologist* 86 (2): 138-142
50. Neher, D. A. (1999.): Nematode communities in organically and conventionally managed agricultural soils, *Journal of Nematology*, 31 (2): 142-154.
51. Neher, D.A. (2001.): Role of Nematodes in Soil Health and Their Use as Indicators, *Journal of Nematology*, 33, 161-168.
52. Neher, D. A., Wu, J., Berbercheck, M. E., Anas, O. (2005.): Ecosystem type affects interpretation of soil nematode community measures. *Applied Soil Ecology*, 30: 47 – 64.
53. Nicholas, W. L. (1984.): *The Biology of Free-living Nematodes*. Second Edition. Oxford: Clarendon Press, 219 pp.
54. Oštrec Lj. (1998.): *Zoologija: Štetne i korisne životinje u poljoprivredi*. Zrinski. Čakovec.
55. *Poljoprivredna enciklopedija* (1970.): 2 Krm-Proi. Jugoslavenski leksikografski savez. Zagreb. pp. 53-55. pp. 306-307.
56. Powers, L.E., McSorley, R. (1994.): Soil nematode community in two tropical pastures, *Nematropica* 24-2:133-141.

57. Raspudić, E., Brmež, M., Majić, I., Sarajlić, A. (2014.): Insekticidi u zaštiti bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek
58. Ritz, K., Trudgill, D.L (1999.): Utility of nematode community analysis as an integrated measure of the functional state of soils: perspectives and challenges. *Plant and Soil* 212, 1–11
59. Roupheal, Y., Colla, G. (2020.): Toward a Sustainable Agriculture Through Plant Biostimulants: From Experimental Data to Practical Applications, *Agronomy* 10, no. 10: 1461.
60. Ryss, A., Pridannikov, M., Subbotin, S. (2022.): Redescription of the root-lesion nematode, *Pratylenchus globulicola* Romaniko, 1960 (Tylenchida: Pratylenchidae) from the Ural Federal District of Russia. *Russian Journal of Nematology*. 30. 89-101.
61. SAS 9.4. Statistical Software (2017.). SAS Institute. Cary, NC. USA.
62. Seinhorst, J.W. (1965): The relation between nematode density and damage to plants. *Nematologica* 11:137-54
63. Siddiqi, M. R. (2000.): Tylenchida parasites of plants and insects, 2nd ed, CABI Publishing, Wallingford, U.K., pp. 883.
64. Sohlenius, B., Wailewska, L. (1984.): Influence of irrigation and fertilization on the nematode community in a Swedish pine forest soil. *Journal of Applied Ecology*. 21: 327-342.
65. Szewczyk, N. J., Mancinelli, R. L. McLamb, W., Reed, D., Blumberg, B. S., Conley, C. A. (2005.): *Caenorhabditis elegans* Survives Atmospheric Breakup of STS–107, Space Shuttle Columbia, *Astrobiology*. 5 (6): 690–705
66. Tejada, M., Benítez, C., Gómez, I, Parrado, J. (2011.): Use of biostimulants on soil restoration: Effects on soil biochemical properties and microbial community, *Applied Soil Ecology*, Volume 49, Pages 11-17,
67. Van Diepeningen, A. D., de Vos, O. J., Korthals, G. W., van Bruggen, A. H. (2006.): Effects of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils. *Applied Soil Ecology*, 31(1-2), 120-135.
68. Wall, D.H. (2004.): *Sustaining Biodiversity and Ecosystem Services in Soils and Sediments*. Island Press, Washington.
69. Wasilewska, L. (1979.): The structure and function of soils nematodes communities in natural ecosystems and agroecosystems. *Polish Ecological Studies*. 5: 97-145.

70. Wood, F.H. (1973.): Biology and host range of *Paratylenchus projectus* Jenkins, 1956 (Nematoda: Criconeematidae) from a sub-alpine tussock grassland. *N. Z. J. Agric. Res.*, 16, 381–384
71. Wu, X., Hu, H., Li, G., Zhao, J., Wang, L., Zhang, G., Xiu, W. (2023.): Chemical fertilizer reduction combined with organic materials enhances nematode community structure stability, *Archives of Agronomy and Soil Science*, 69:3, 399-416,
72. Yeates, G.W. (1982.): Variation in soil nematode diversity under pasture with soil and year. *Soil.Biol.Biochem.* 16-2: 95-102.
73. Yeates, G.W., Bongers, T., de Goede, R.G.M., Freckman, D.W., Georgieva, S.S. (1993.): Feeding habits in nematode families and genera. An outline for soil ecologists. *Journal of Nematology* 25: 315-331.
74. Yeates, G.W., Boag, B. (2006.): Female size shows similar trends in all clades of the Phylum Nematoda. *Journal of Nematology*, 8: 111-127
75. Yeates, G.W., Ferris, H., Moens, T., Van der Putten, W.H. (2009.): *The Role of Nematode in Ecosystems*. U: Wilson, M.J. i Kakouli-Duarte, T. (ur.): *Nematodes as environmental indicators*. CABI Publishing.
76. Zhang, X., Jiang, Y., Liang, L., Zhao X., Li, Q. (2009.): Response of soil nematode communities to long-term application of inorganic fertilizers in the black soil of Northeast China, *Frontiers of Biology in China*, 4 (1): 111-116.
77. Zullini, A. (1976.): Nematodes as indicators of river pollution, *Nematologia Mediterranea*, 4: 13-22
78. Zunke, U. (1990.): Ectoparasitic feeding behavior of the root lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*, on root hairs of different host plants. *Revue de Nématologie* 13:331–7

Internetski izvori:

1. NVBDCP - National Center for Vector Borne Diseases Control (NCVBDC), Ministry of Health & Family Welfare, Government of India, 27. 6. 2023.
2. Wikipedia - <http://en.wikipedia.org/wiki/Nematode>, 01.07.2023.

8. SAŽETAK

Cilj ovoga rada bio je odrediti bioraznolikost zajednice nematoda u tlu pod utjecajem različitih kombinacija biostimulatora i mineralne gnojidbe. Pokus je proveden na usjevu pšenice u dva ponavljanja, u travnju i srpnju 2021. godine u četiri tretmana. Prvi tretmanu bio je kontrolni i bez dodatka gnojidbe. U drugom tretmanu koristili su se biostimulatori Ekobuster i Ekovital. U trećem tretmanu primijenila se mineralna gnojidba, dok je četvrti tretman obuhvaćao kombinaciju biostimulatora i mineralne gnojidbe. Rezultati su pokazali da je u proljetnim mjesecima populacija nematoda u tlu znatno veća nego ljeti, jer je tada količina vlage u tlu povećana, a život nematoda usko je vezan za film vode oko čestica tla. Osim toga, bioraznolikost nematoda u tlu bila je najveća u tretmanu sa biostimulatorima, veća i od kontrole, što znači da se ujedno obogatilo tlo. Udio omnivora i predatora, koji su odraz stabilnog i strukturiranog tla, najveći je bio u tretmanu s biostimulatorima, što ukazuje da je tlo u tretmanu 2 bilo najkvalitetnije. Indeksi uznemirenja tla (MI 2-5, PPI) pokazali su najbolje vrijednosti (stabilniji ekosustav, manja prisutnost biljnoparazitnih nematoda, veća prisutnost korisne nematofaune, itd.) u tretmanu s Ekobusterom i Ekovitalom, pogotovo uspoređujući s kemijskim tretiranjem. Iz navedenih rezultata, može se zaključiti kako uporaba biostimulatora Ekobuster i Ekovital može poboljšati kvalitetu tla, povećavajući tako raznolikost nematoda i količinu hraniva u tlu, a time i smanjiti ekonomske troškove.

Ključne riječi: nematode, bioraznolikost, trofičke grupe, biostimulatori, pšenica

9. SUMMARY

The aim of this work was to determine the biodiversity of the nematode community in the soil under the influence of different combinations of biostimulators and mineral fertilization. The experiment was carried out on a wheat crop in two repetitions, in April and July 2021 in four treatments. The first treatment was control and without any addition of fertilization. In the second treatment, biostimulators Ekobuster and Ekovital were used. In the third treatment, mineral fertilization was applied, while the fourth treatment included a combination of biostimulators and mineral fertilizer. The results showed that in the spring months the population of nematodes in the soil is significantly higher than in the summer, because the amount of moisture in the soil is increased, and the life of nematodes is closely related to the film of water around the soil particles. In addition, the biodiversity of nematodes in the soil was the highest in the treatment with biostimulators, higher than the control, which means that the soil was enriched at the same time. The share of omnivores and predators, which are a reflection of stable and structured soil, was the highest in the treatment with biostimulators, which indicates that the soil in treatment 2 has of the highest quality. Soil disturbance indices (MI 2-5, PPI) showed the best values (more stable ecosystem, lower presence of plant-parasitic nematodes, higher presence of useful nematofauna, etc.) in the treatment with Ekobuster and Ekovital, especially when compared to chemical treatment. From the above results, it can be concluded that the use of biostimulators Ekobuster and Ekovital can improve soil quality, thus increasing the diversity of nematodes and the amount of nutrients in the soil, and thus reduce economic costs.

Key words: nematodes, biodiversity, trophic groups, biostimulators, wheat

10. POPIS SLIKA

| | |
|--|----|
| Slika 1. Prisutnost nematoda u svijetu, izbrojene u 100 g suhog tla | 1 |
| Slika 2. Cistolika nematoda <i>Globodera rostochiensis</i> (zlatna krumpirova nematoda)..... | 4 |
| Slika 3. Anulacija nematoda | 5 |
| Slika 4. Građa tijela nematoda..... | 6 |
| Slika 5. Pravi stilet ili stomatostilet (<i>Hoplolamus</i>)..... | 7 |
| Slika 6. Odontostilet (<i>Xiphinema</i>) | 7 |
| Slika 7. Usna šupljina sa zubom i zubićima predatora | 7 |
| Slika 8.a) Amfidi, b) Papile | 7 |
| Slika 9. Živčani sustav nematoda | 8 |
| Slika 10. Muški spolni organ – Spikula..... | 9 |
| Slika 11. Ženski spolni organ – vulva | 9 |
| Slika 12. Građa tijela nematoda..... | 9 |
| Slika 13. Životni ciklus nematoda | 11 |
| Slika 14. Struktura usnog ustroja nematoda prema načinu ishrane..... | 14 |
| Slika 15. Ektoparazitne nematode | 16 |
| Slika 16. Endoparazitne nematode | 16 |
| Slika 17. Kalibracija ekosustava c-p grupama..... | 19 |
| Slika 18. Baermanova metoda izdvajanja nematoda iz tla pomoću lijevaka..... | 24 |

11. POPIS GRAFIKONA

| | |
|---|----|
| Grafikon 1. Broj rodova nematoda po tretmanima..... | 25 |
| Grafikon 2. Udio bakterivora po tretmanima | 26 |
| Grafikon 3. Udio fungivora po tretmanima | 27 |
| Grafikon 4. Udio fitoparazita po tretmanima | 28 |
| Grafikon 5. Udio omnivora po tretmanima | 29 |
| Grafikon 6. Udio predatora po tretmanima | 30 |
| Grafikon 7. Vrijednosti indeksa zrelosti tla (MI) 2-5 po tretmanima | 31 |
| Grafikon 8. Vrijednosti bljnoparazitskog indeksa (PPI) po tretmanima..... | 32 |
| Grafikon 9. Vrijednosti baznih indeksa (BI) po tretmanima | 33 |
| Grafikon 10. Vrijednosti strukturnih indeksa (SI) po tretmanima..... | 34 |

TEMELJNA DOKUMENTAIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski rad

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Sveučilišni diplomski studij, Zaštita bilja

UTJECAJ BIOSTIMULATORA I MINERALNE GNOJIDBE NA BIORAZNOLIKOST I STRUKTURU ZAJEDNICE NEMATODA U PŠENICI

Gloria Ninković

Sažetak

Cilj ovoga rada bio je odrediti bioraznolikost zajednice nematoda u tlu pod utjecajem različitih kombinacija biostimulatora i mineralne gnojidbe. Pokus je proveden na usjevu pšenice u dva ponavljanja, u travnju i srpnju 2021. godine u četiri tretmana. Prvi tretmanu bio je kontrolni i bez dodatka gnojidbe. U drugom tretmanu koristili su se biostimulatori Ekobuster i Ekovital. U trećem tretmanu primijenila se mineralna gnojidba, dok je četvrti tretman obuhvaćao kombinaciju biostimulatora i mineralne gnojidbe. Rezultati su pokazali da je u proljetnim mjesecima populacija nematoda u tlu znatno veća nego ljeti, jer je tada količina vlage u tlu povećana, a život nematoda usko je vezan za film vode oko čestica tla. Osim toga, bioraznolikost nematoda u tlu bila je najveća u tretmanu sa biostimulatorima, veća i od kontrole, što znači da se ujedno obogatilo tlo. Udio omnivora i predatora, koji su odraz stabilnog i strukturiranog tla, najveći je bio u tretmanu s biostimulatorima, što ukazuje da je tlo u tretmanu 2 bilo najkvalitetnije. Indeksi uznemirenja tla (MI 2-5, PPI) pokazali su najbolje vrijednosti (stabilniji ekosustav, manja prisutnost biljnoparazitnih nematoda, veća prisutnost korisne nematofaune, itd.) u tretmanu s Ekobusterom i Ekovitalom, pogotovo uspoređujući s kemijskim tretiranjem. Iz navedenih rezultata, može se zaključiti kako uporaba biostimulatora Ekobuster i Ekovital može poboljšati kvalitetu tla, povećavajući tako raznolikost nematoda i količinu hraniva u tlu, a time i smanjiti ekonomske troškove.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: prof.dr.sc. Mirjana Brmež

Broj stranica: 47

Broj grafikona i slika: 28 (10 grafikona i 18 slika)

Broj literaturnih navoda: 80

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: nematode, bioraznolikost, trofičke grupe, biostimulatori, pšenica

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof.dr.sc. Brigita Popović
2. Prof.dr.sc. Mirjana Brmež, mentor
3. Dr.sc. Josipa Puškarić, član
4. Prof.dr.sc. Karolina Vrandečić, zamjenski član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Vladimira Preloga 1, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Graduate thesis
Faculty of Agriculture
University Graduate Studies, Plant production

THE INFLUENCE OF BIOSTIMULATORS AND MINERAL FERTILIZERS ON THE BIODIVERSITY AND STRUCTURE OF THE NEMATODE COMMUNITY IN WHEAT

Gloria Ninković

Abstract:

The aim of this work was to determine the biodiversity of the nematode community in the soil under the influence of different combinations of biostimulators and mineral fertilization. The experiment was carried out on a wheat crop in two repetitions, in April and July 2021 in four treatments. The first treatment was control and without any addition of fertilization. In the second treatment, biostimulators Ekobuster and Ekovital were used. In the third treatment, mineral fertilization was applied, while the fourth treatment included a combination of biostimulators and mineral fertilizer. The results showed that in the spring months the population of nematodes in the soil is significantly higher than in the summer, because the amount of moisture in the soil is increased, and the life of nematodes is closely related to the film of water around the soil particles. In addition, the biodiversity of nematodes in the soil was the highest in the treatment with biostimulators, higher than the control, which means that the soil was enriched at the same time. The share of omnivores and predators, which are a reflection of stable and structured soil, was the highest in the treatment with biostimulators, which indicates that the soil in treatment 2 has of the highest quality. Soil disturbance indices (MI 2-5, PPI) showed the best values (more stable ecosystem, lower presence of plant-parasitic nematodes, higher presence of useful nematofauna, etc.) in the treatment with Ekobuster and Ekovital, especially when compared to chemical treatment. From the above results, it can be concluded that the use of biostimulators Ekobuster and Ekovital can improve soil quality, thus increasing the diversity of nematodes and the amount of nutrients in the soil, and thus reduce economic costs.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek

Mentor: prof.dr.sc. Mirjana Brmež

Number of pages: 47

Number of figures: 28 (10 graphs and 18 pictures)

Number of references: 80

Original in: Croatian

Key words: nematodes, biodiversity, trophic groups, biostimulators, wheat

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. PhD Professor Brigita Popović, president
2. PhD Professor. Mirjana Brmež, supervisor
3. PhD. Josipa Puškarić, member
4. PhD Professor Karolina Vrandečić, alternate member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1, Osijek.