

**VPLIV FILTRATOV KORENINSKIH IZLOČKOV IZBRANIH VRST
POSEVKOV NA ZMANJŠANJE POPULACIJE OGORČIC VRSTE *Xiphinema
index* Thorne & Allen, 1950 V *in vitro* RAZMERAH**

Julija POLANŠEK^{1,2}, Saša ŠIRCA³

^{1,3} Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana

IZVLEČEK

Ogorčice vrste *Xiphinema index* Thorne & Allen, 1950 so rastlinski paraziti, katerih glavna gostiteljica je vinska trta (*Vitis vinifera* L.). Ogorčice te vrste se prosto gibljejo v tleh in se prehranjujejo na koreninah gostiteljske rastline. Z značilnim močnim bodalom lahko prodrejo v korenine vinske trte in iz rastlin črpajo celični sok. Ne le, da rastline na ta način izčrpavajo in s poškodbami na koreninah omogočajo lažji vstop drugim patogenom v rastlino, temveč so pomembne predvsem z vidika prenosa virusa. Ogorčice vrste *X. index* so prenašalke virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV). Z omenjenim virusom okužen vinograd se odraža v zmanjšanem pridelku, pridelek je slabše kakovosti, trte imajo krajšo življenjsko dobo, prav tako so dovzetnejše na vplive sprememb v okolju. V vinogradih lahko bolezen prepoznamo po rumenenju in deformaciji listov ter nepravilnem izraščanju poganjkov. Ker je viruse v kasnejši fazi rasti nemogoče izločiti iz rastlin, je smiselno pozornost posvetiti preprečevanju širjenja oz. eliminaciji prenašalcev virusa, torej ogorčic *X. index*. V poskusu smo se osredotočili na različne izbrane posevke, ki bi lahko s svojimi koreninskimi izločki vplivali na preživetje ogorčic vrste *X. index*. V lončke s peščenim substratom smo posejali 8 različnih posevkov (bela lupina – *Lupinus albus* L., grašica – *Vicia vilosa* Roth, inkarnatka – *Trifolium incarnatum* L., ječmen – *Hordeum vulgare* L., lucerna – *Medicago sativa* L., oves – *Avena sativa* L., sončnica – *Helianthus* sp. L., žametnica – *Tagetes* sp. L.), kot negativno kontrolo smo uporabili peščen substrat brez posevka, pozitivno kontrolo pa je predstavljal registriran nematocid Velum Prime®. Neposredno delovanje različnih filtratov koreninskih izločkov na ogorčice smo preverjali v *in vitro* pogojih z mikrotitrskimi ploščami. Izkazalo se je, da je imel negativen vpliv na preživetje ogorčic vrste *X. index* poleg nematocida še ječmen. Z nadaljnjimi raziskavami bomo poskušali ugotoviti, kaj točno je vplivalo na smrtnost ogorčic – koreninski izločki ali morebiti kateri od drugih prisotnih biotičnih agensov.

Ključne besede: biotično varstvo, GFLV, ječmen, koreninski izločki, *Xiphinema index*

¹ mag. inž. hort., Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, e-naslov: julija.polansek@kis.si

² Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

³ dr., Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

ABSTRACT

IMPACT OF FILTRATED ROOT EXUDATES FROM SELECTED CROP VARIETIES ON THE REDUCTION OF POPULATION NEMATODE SPECIES *Xiphinema index* Thorne & Allen, 1950 UNDER *in vitro* CONDITIONS

The nematode species *Xiphinema index* Thorne & Allen, 1950, known as plant-parasitic organisms predominantly infesting the grapevine (*Vitis vinifera* L.) as their primary host. These nematodes exhibit free-living mobility within the soil matrix, where they target the roots of plants. Their typical robust stylet enables the penetration of grapevine roots, facilitating the pumping of cytoplasm from plant cells. In addition to depleting plant vitality, they play a crucial role as vectors for the Grapevine fanleaf virus (GFLV), resulting in reduced yields, compromised quality, shortened vine longevity, and increased susceptibility to environmental stresses in infected vineyards. The disease symptoms including leaf chlorosis, deformation, and anomalous shoot growth were observed. Due to ineffective challenges in eliminating the virus from plants post-infection, the focus shifts to controlling the spread of the primary vector *X. index*, or its complete eradication. With experiments, we tried to explore the impact of root exudates from selected crop varieties on nematode survival. We sowed eight cultivars (white lupin – *Lupinus albus* L., hairy vetch – *Vicia vilosa* Roth, crimson clover – *Trifolium incarnatum* L., barley – *Hordeum vulgare* L., lucerne – *Medicago sativa* L., oat – *Avena sativa* L., sunflower – *Helianthus annuus* L., marigold – *Tagetes* sp. L.) in pots with sandy substrate. The experimental design incorporated a negative control, a bare-sandy substrate, and a positive control wherein we used the registered nematicide Velum Prime®. We evaluated the direct impact of selected root exudate filtrates on *X. index* nematodes under *in vitro* conditions utilizing microtiter plates. The research revealed an effect on the reduction of the *X. index* nematode population with the positive control (nematicide) and also with the barley cultivar. Subsequent research aims to discover the specific determinants affecting nematode mortality, researching the contributions of root exudates and other potentially involved biotic agents that were possibly presented in the experimental milieu.

Key words: barley, biological control, GFLV, root exudates, *Xiphinema index*

1 UVOD

Ogorčice so najštevilčnejši večcelični organizmi na planetu, med katere uvrščamo tudi parazite rastlin in živali (Coghlan, 2005). Rastlinsko-parazitske ogorčice so gospodarsko in okoljsko zelo pomembne, saj povzročajo škodo in velike izgube pridelkov na kmetijskih rastlinah in v gozdovih po vsem svetu (Nicol in sod., 2011; Kiontke in Fitch, 2013; Degenkolb in Vilcinskis, 2016). Večje izpade pridelka beležijo tudi v vinogradih, kjer se pojavljajo ogorčice vrste *Xiphinema index*. Prav vinska trta je njihova glavna gostiteljica, za trte pa predstavljajo grožnjo s prenašanjem virusa pahljačavosti listov vinske trte in neposrednimi poškodbami na koreninah. Ogorčice *X. index* se zadržujejo v tleh, predvsem na območju koreninskega sistema vinske trte. Ker se lahko nahajajo globoko v tleh in so precej trdožive, se je izkazalo, da je trenutno najučinkovitejši pristop zatiranja *X. index* dolgoletna praha in odstranitev koreninskih

ostankov iz tal po izkrcitvi vinograda, a je iz ekonomskega vidika ta pristop za vinogradnike pogosto nepriljubljen (Andret-Link in sod., 2004). Običajno je nadzor in obvladovanje rastlinsko-parazitskih ogorčic težavno zaradi širokega kroga gostiteljev, množičnega razmnoževanja in prostega ter nenadzorovanega širjenja. Dodatno je obvladovanje ogorčic problematično zaradi nezadostne učinkovitosti različnih pristopov ter visokih stroškov (Wolfgang in sod., 2019). Zaradi svoje relativno visoke učinkovitosti in hitrega učinka so najbolj uveljavljeni kemični nematocidi, vendar je uporaba kemičnih pripravkov vprašljiva predvsem zaradi toksičnosti, tolerance škodljivcev in obstojnosti ter škodljivosti za okolje (Villalta in Kierszenbaum, 1987; Tian in sod., 2007; Zeng in sod., 2015; Gao in sod., 2016). Prav zaradi omenjenih razlogov je vse več kemičnih pripravkov umaknjenih s tržišča ali pa so podvrženi strogim regulativam (Tzortzakakis in sod., 2024). Večkrat se je že izkazalo, da so bili nematocidi učinkoviti v lončnih poskusih (Hafez in sod., 1981), a je bilo njihovo delovanje precej slabše in omejeno v primeru uporabe na terenu (Valenzuela in Aballay, 1996). Za učinkovitejše delovanje proti ogorčicam je potreben večkratni nanos nematocidov, zaradi prostorske razporeditve ogorčic v tleh pa je prav tako težaven vnos nematocidov v globlje plasti tal (Whitehead, 1998). Zaradi naštetega je večja potreba po razvoju alternativnih in varnejših pristopih obvladovanja rastlinsko-parazitskih ogorčic, kot je uporaba različnih posevkov, ki imajo lahko negativen vpliv na ogorčice.

225

2 MATERIAL IN METODE

Opravili smo poskus vpliva filtratov koreninskih izločkov različnih posevkov na populacijo ogorčic, ki je bil izveden v dveh delih. Tako lončni kot *in vitro* poskus sta bila izvedena na Kmetijskem inštitutu Slovenije. Prvi del poskusa je predstavljal lončni poskus, kjer smo v substrat na gosto posejali 8 različnih posevkov (bela lupina – *Lupinus albus* L., grašica – *Vicia vilosa* Roth, inkarnatka – *Trifolium incarnatum* L., ječmen – *Hordeum vulgare* L., lucerna – *Medicago sativa* L., oves – *Avena sativa* L., sončnica – *Helianthus* sp. L., žametnica – *Tagetes* sp. L.). Lončke premera 10 cm smo napolnili s kremenovim peskom granulacije 0,09 – 0,71 mm, na dno lončkov smo dodali filter papir, da ni prihajalo do spiranja substrata skozi odtočni sistem. Lončki in substrat so bili predhodno avtoklavirani. Lončni poskus smo nato izvajali pod nadzorovanimi pogoji v rastlinjaku. Ko so rastline razvile dovolj bujen koreninski sistem, smo poskus nadaljevali v nematološkem laboratoriju. Iz lončnega poskusa smo pridobili filtrate koreninskih izločkov vseh osmih posevkov. Lončke smo zalili do saturacije in po odtoku gravitacijske vode smo pod lončke postavili petrijevke. Po 24 urah smo v lončke dolili 30 ml vode. V petrijevkah zbrano tekočino smo z 10 ml brizgo in dodanim 0,2 µm filtrom odpipetirali v čaše in tako pripravili filtrat vodne raztopine koreninskih izločkov.

Za drugi del poskusa smo pridobili vinogradniška tla iz vinorodnega okoliša Goriška brda, kjer smo predhodno preverili, da je populacija ogorčic *X. index* v tleh zelo visoka (70 ogorčic / 200 g tal). Po prenosu vzorcev tal v laboratorij, smo ogorčice izločili z metodo vrtničenja (povzeto po Cobb, 1918; Flegg, 1967; v EPPO, 2013), sledila je detekcija in identifikacija *X. index* s pomočjo stereomikroskopa. Iz vzorcev smo ogorčice ročno izločili in jih uporabili za nadaljevanje poskusa.

V mikrotitrski plošče 3×4 z volumnom posameznega razdelka 5,96 ml smo v vsakega odpipetirali po 2 ml predhodno pridobljenih filtratov vodne raztopine koreninskih izločkov. Za vsak posevek smo poskus izvedli v petih ponovitvah. Negativno kontrolo je

predstavljal substrat brez posevka. Za pozitivno kontrolo smo uporabili komercialni pripravek nematocid Velum Prime® proizvajalca Bayer, s koncentracijo 15,6 µl/L. Ko so bili vsi razdelki zapolnjeni, smo v posameznega dodali po 2 odrasli samici in 3 ličinke ogorčic *X. index*. Tako pripravljene mikrotiterske plošče smo hranili v temen prostor in vsakodnevno spremljali učinek raztopine na preživetje ogorčic. Ogorčice so bile koreninskim izločkom izpostavljene 10 dni. Preživetje in vitalnost posameznih ogorčic v obravnavanjih smo ocenjevali s pomočjo tresenja in dotikanja ogorčic s tanko nematološko iglo. Vsa opažanja in število preživelih ogorčic smo sproti beležili v za to pripravljeno tabelo.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Vsaki od petih ponovitev na obravnavanje je bilo dodanih po 5 ogorčic *X. index* (2 samici in 3 ličinke). Po 10 dnevni izpostavljenosti ogorčic različnim posevkom in kontrolama je na smrtnost ogorčic najslabše vplivala raztopina koreninskih izločkov sončnic (S), saj je po 10 dneh preživel 98,8 % ogorčic. Z ovrednotenjem nematocidnih učinkov različnih koreninskih izločkov proti ogorčicam *X. index* glede na kontrolno obravnavanje se je izkazalo, da sta pozitivna kontrola in posevek ječmena statistično značilno negativno vplivala na ogorčice *X. index* (Tabela 1). Preživetje ogorčic je bilo najnižje pri izpostavljenosti komercialnemu nematocidu (pozitivna kontrola) in sicer 35,2 %, medtem ko je pri izpostavljenosti ogorčic koreninskemu izločku ječmena po 10 dneh preživel 36 % ogorčic. Preživetje ogorčic v raztopini koreninskih izločkov ječmena statistično značilno ni odstopala od pozitivne kontrole – nematocida.

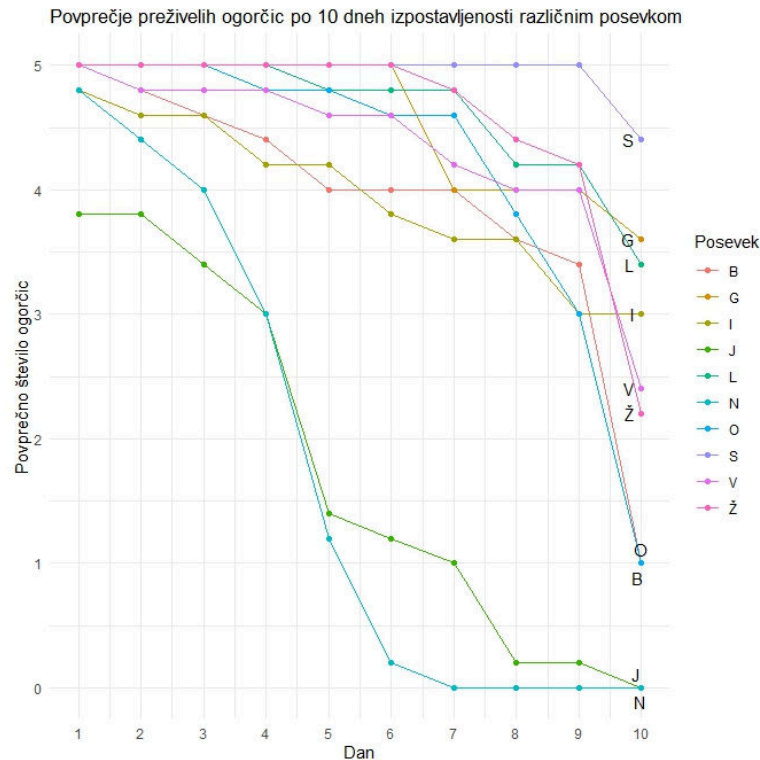
226

Preglednica 1: Povprečje preživelih ogorčic na obravnavanje.

Posevek	Povprečje ± SD	Odstotek preživelih ogorčic (%)
Bela lupina (B)	3,88 ± 1,38 b	77,6
Grašica (G)	4,56 ± 0,67 bc	91,2
Inkarnatka (I)	3,94 ± 0,98 b	78,8
Ječmen (J)	1,80 ± 1,70 a	36,0
Lucerna (L)	4,62 ± 0,70 bc	92,4
Oves (O)	4,16 ± 1,38 b	83,2
Sončnice (S)	4,94 ± 0,31 c	98,8
Žametnica (Ž)	4,56 ± 0,95 bc	91,2
Pozitivna kontrola (N)	1,76 ± 2,01 a	35,2
Negativna kontrola (V)	4,32 ± 1,02 bc	86,4

Po 24-urni izpostavljenosti ogorčic koreninskim izločkom ječmena v *in vitro* poskusu, so bile opazovane ogorčice vidno počasnejše, okornejše in večinoma v negibni C obliki, kar je značilno za mrtve ogorčice. Šele po večkratnih poskusih drezanja z nematološko iglo so se začele ogorčice premikati. Najhitrejši vpliv koreninskih izločkov na ogorčice je bil prav pri ječmenu, saj smo v tem primeru že naslednji dan beležili najvišjo smrtnost ogorčic. Nato se je aktivnost izločka ječmena in pozitivne kontrole izrazito povečala

četrti dan od pričetka poskusa (Slika 1). Najvišjo in najhitrejšo smrtnost ogorčic pričakovano beležimo pri direktni izpostavljenosti ogorčic pozitivni kontroli – nematocid, ki vsebuje aktivno snov fluopiram.



Slika 1: Povprečje preživelih ogorčic pri 10 dnevni izpostavljenosti različnim obravnavanjem (B–*Lupinus albus*, G–*Vicia vilosa*, I–*Trifolium incarnatum*, J–*Hordeum vulgare*, L–*Medicago sativa*, O–*Avena sativa*, S–*Helianthus* sp., Ž–*Tagetes* sp., N–nematocid, V–negativna kontrola).

4 SKLEPI

V poskusu je imel na smrtnost ogorčic največji vpliv nematocid Velum Prime®, kateremu so bile neposredno izpostavljene. Trenutno se omenjeni nematocid ne sme uporabljati za zatiranje ogorčic v vinogradništvu, ker ni registriran za vinsko trto. Tudi v kolikor bi bila aplikacija tega nematocida dovoljena, bi bila verjetno učinkovitost precej slabša zaradi prostorske razporeditve ogorčic v tleh. Nahajajo se predvsem na območju korenin vinske trte, kar pa je lahko zelo globoko. Ciljna aplikacija nematocida je v tem primeru vprašljiva. Prav tako je tveganje za razvoj rezistence (odpornosti) na aktivno snov, ki jo omenjeni nematocid vsebuje – fluopiram srednje do veliko, kar pa dolgoročno v vinogradih ne predstavlja rešitve, saj gre za trajne nasade. Mobilnost

nematicidov v tleh je odvisna od njihove topnosti v vodi, kot tudi od sposobnosti molekulske vezave v tleh (absorpcija tal). Fluopiram ima visok koeficient vezave v tleh in nizko topnost v vodi, temu lahko pripisujemo tudi slabšo mobilnost v tleh (Lewis in sod., 2016). Pri uporabi posevkov pa gre za počasnejše in enakomernejše sproščanje koreninskih izločkov v tla, kar bi lahko vodilo do višje učinkovitosti.

Z *in vitro* poskusom smo ugotovili, da je delovanje ječmena na ogorčice *X. index* primerljivo z učinkovitostjo nematocida. Na podlagi dosedanjih raziskav bomo z nadaljnjimi raziskavami poskušali ugotoviti način delovanja koreninskih izločkov ječmena na smrtnost ogorčic. Preučiti je potrebno, ali koreninski izločki vsebujejo določene nematotoksične snovi, ali pa je bila smrtnost ogorčic dosežena zaradi katerih drugih dejavnikov, npr. prisotnost določenih biotičnih agensov.

5 ZAHVALA

Zahvala za finančno podporo pri izvedbi raziskave gre Javni agenciji za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS) in programski skupini Agrobiodiverziteteta (P4-0072) v okviru financiranja programa usposabljanja mladih raziskovalcev. Zahvala gre tudi sodelavcem Oddelka za varstvo rastlin in vinogradniku za pomoč pri izvedbi poskusa.

6 LITERATURA

228

- Andret-Link P., Laporte C., Valat L., Ritzenthaler C., Demangeat G., Vigne E., Laval V., Pfeiffer P., Stussi-Garaud C., Fuchs M. 2004. Grapevine Fanleaf Virus: still a major threat to the grapevine industry. *J. Plant Pathol.* 86, 183–195.
- Cobb, N. A. 1918. Estimating the nema populations of soil. *USDA Technical Circular* 1, str. 48.
- Coghlan A. 2005. Nematode genome evolution. *WormBook*, pp. 1–15, <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.15.1>.
- Degenkolb T., Vilcinskas A. 2016. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (9), 3799–3812, <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7233-6>.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013. Nematode extraction. *Diagnostics PM 7/119* (1). *EPPO Bulletin*, 43, 471–495.
- Flegg, J.J.M. 1967. Extraction of *Xiphinema* and *Longidorus* species from soil by a modification of Cobb's decanting and sieving technique. *Annals of Applied Biology*, 60, 429–437. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1967.tb04497.x>.
- Gao H., Qi G., Yin R., Zhang H., Li C., Zhao X. 2016. *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematicidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine, *Sci. Rep.* 6, <https://doi.org/10.1038/srep28756>, 28756.
- Hafez S.L., Raski D.J., Lear B. 1981. Action of systemic nematicides in control of *Xiphinema index* on grape. *J. Nematol.* 13, 24–29.
- Kiontke K., Fitch D.H. 2013. Nematodes, *Curr. Biol.* 23 (19), R862–R864, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.009>.
- Lewis K.A., Tzilivakis J., Warner D., Green A. 2016. An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 22 (4), 1050–1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>.
- Nicol J.M., Turner S.J., Coyne D.L., Nijs Ld., Hockland S., Maafi Z.T. 2011. Current nematode threats to world agriculture, v: Jones J., Gheysen G., Fenoll C. (Ur.), *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2011, pp. 21–43.

- Tian B., Yang J., Zhang K.Q. 2007. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects, *FEMS Microbiol. Ecol.* 61 (2), 197–213, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00349.x>.
- Tzortzakakis E.A., Thoden T.C., Chatzaki A. 2024. Investigation of fluazaindolizine as a potential novel tool to manage *Xiphinema index*. *Crop Protection* 180 (2024) 106636, <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.106636>
- Valenzuela A., Aballay E. 1996. Chemical control of *Xiphinema index* in Chilean grape vineyards. *Nematropica* 26, 177–179.
- Villalta F., Kierszenbaum F. 1987. Insect-borne and culture-derived metacyclic *Trypanosoma cruzi*: differences in infectivity and virulence, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36 (3), 529–532, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.36.529>.
- Whitehead A.G. 1998. *Plant Nematode Control*. CAB International, Wallingford, UK, p. 384.
- Wolfgang A., Taffner J., Guimaraes R.A., Coyne D., Berg G. 2019. Novel strategies for soil-borne diseases: exploiting the microbiome and volatile-based mechanisms toward controlling meloidogyne-based disease complexes, *Front. Microbiol.* 10, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01296>, 1296.
- Zeng L., Jin H., Lu D., Yang X., Pan L., Cui H., He X., Qiu H., Qin B. 2015. Isolation and identification of chemical constituents from the bacterium *Bacillus* sp. and their nematicidal activities, *J. Basic Microbiol.* 55 (10), 1239–1244, <https://doi.org/10.1002/jobm.201400798>.